



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

**ANIDRASI CARBONICA: SINTESI DI SOLFONAMMIDI
BENZOTIOPIRANO-PIRIMIDINICHE QUALI POTENZIALI
INIBITORI ISOFORMA SELETTIVI**

Relatori:

Prof.ssa Sabrina Taliani

Dott.ssa Elisabetta Barresi

Dott.ssa Silvia Salerno

Candidata:

Sara Pescagliani

INDICE

<i>PARTE GENERALE</i>	2
1. Introduzione.	3
2. Meccanismo catalitico delle anidrase carboniche e loro inibizione	6
2.1 α -CAs.	8
3. Utilizzo clinico generale degli inibitori dell'anidrase carbonica.	11
3.1. Inibitori dell'anidrase carbonica per il trattamento del glaucoma.	18
3.2. Inibitori dell'anidrase carbonica utilizzati come potenziali farmaci antitumorali.	23
3.3. Inibitori dell'anidrase carbonica utilizzati nella diagnosi del cancro.	30
3.4. Inibitori dell'anidrase carbonica utilizzati come diuretici.	31
3.5. Inibitori dell'anidrase carbonica utilizzati nel trattamento dell'osteoporosi.	33
3.6. Inibitori dell'anidrase carbonica utilizzati come potenziali farmaci antiobesità.	34
<i>INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE</i>	38
<i>PARTE SPERIMENTALE</i>	51
Materiali e metodi	52
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	58
<i>RINGRAZIAMENTI</i>	68

Parte Generale

1 INTRODUZIONE

Le ANIDRASI CARBONICHE (CAs) sono una superfamiglia di metalloenzimi (zinco-enzimi) che catalizzano l'interconversione tra anidride carbonica e ione bicarbonato. Hanno una distribuzione ubiquitaria e si ritrovano sia a livello dei procarioti sia degli eucarioti. Sono codificate da cinque distinte famiglie genetiche di diversa evoluzione:

- α -CAs: presenti nei vertebrati, nei batteri, nelle alghe e nel citoplasma delle piante verdi
- β -CAs: presenti principalmente nei batteri, nelle alghe e nei cloroplasti sia delle mono- che delle di-cotiledoni.
- γ -CAs: presenti soprattutto negli archeobatteri e in altri tipi di batteri.
- δ -CAs: presenti in qualche diatomea marina.
- ζ -CAs: presenti in qualche diatomea marina.

Nei vertebrati più sviluppati, compresi gli esseri umani, sono stati scoperti quattordici differenti isoenzimi delle α -CA, i quali sono stati numerati da I a XIV. Recentemente, un ulteriore enzima CA (CA XV) è stato evidenziato in numerose specie animali, eccetto che negli esseri umani e negli scimpanzé.

Gli isoenzimi delle anidrasi carboniche si distinguono in base alla diversa distribuzione tissutale e subcellulare o in base alla modulazione dell'attività catalitica (idratazione della CO_2), dovuta alle differenze strutturali presenti nel loro sito attivo (tabella 1) ^[1,2]. Le CAs sono:

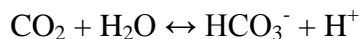
- citosoliche (isoenzimi I, II, III, VII, XIII)
- mitocondriali (isoenzimi VA, VB)
- legate alla membrana (isoenzimi IV, IX, XII, XIV, XV)
- secrete nella saliva (isoenzima VI).

Sono stati individuati altri isoenzimi nel citosol, noti come CARPs (proteine legate all'anidrasi carbonica) che non sono dotati di attività catalitica poiché non sono presenti residui di istidina, necessari per legare lo ione zinco.

Tabella1: isoenzimi α -CA nei vertebrati superiori

Isoenzima	Attività catalitica idratazione CO₂	Affinità per le solfonammidi	Localizzazione subcellulare
CA I	Moderata	Media	Citosol
CA II	Alta	Molto alta	Citosol
CA III	Molto bassa	Molto bassa	Citosol
CA IV	Alta	Alta	Legato alla membrana
CA VA	Bassa-Moderata	Alta	Mitocondrio
CA VB	Alta	Alta	Mitocondrio
CA VI	Moderata	Alta	Secreto nella saliva/latte
CA VII	Alta	Molto alta	Citosol
CARP VIII	Acatalitica	Sconosciuta	Citosol
CA IX	Moderata-Alta	Alta	Transmembrana
CARP X	Acatalitica	Sconosciuta	Secreto
CARP XI	Acatalitica	Sconosciuta	Secreto
CA XII	Bassa	Molto alta	Transmembrana
CA XIII	Moderata	Medio-Alta	Citosol
CA XIV	Moderata	Alta	Transmembrana
CA XV	Bassa	Sconosciuta	Legato alla membrana

Le CAs catalizzano l'interconversione tra anidride carbonica e ione bicarbonato:



In assenza di catalizzatore la reazione è lenta in condizioni fisiologiche, ma diventa molto veloce in presenza dell'enzima. Le CAs sono quindi coinvolte in processi fisiologici connessi alla respirazione e al trasporto di CO_2 /bicarbonato attraverso i tessuti di metabolizzazione e i polmoni. Esse, inoltre, regolano il pH e l'omeostasi della CO_2 , la secrezione di elettroliti in una varietà di tessuti e organi, le reazioni di biosintesi (come la gluconeogenesi, la lipogenesi e l'urogenesi), il riassorbimento osseo e la calcificazione. Alcuni recenti esperimenti, hanno dimostrato che le CAs sono probabilmente anche coinvolte in alcuni processi patologici (tumorigenecità, obesità, epilessia) ^[2,3].

Oltre alle reazioni fisiologiche, come l'idratazione reversibile della CO_2 a bicarbonato (reazione 1.1, figura 1) le α -CAs catalizzano altre reazioni:

- l'idratazione del cianato ad acido carbammico, o della cianammide ad urea (reazioni 1.2 e 1.3)
- L'idratazione dell'aldeide a gem-diolo (reazione 1.4)
- L'idrolisi dell'estere carbossilico o solfonico (reazioni 1.5 e 1.6) e altri processi idrolitici minori, come quelli descritti dalle reazioni 1.7-1.9 in Figura 1 ^[3]

$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	1.1
$\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{NCOOH}$	1.2
$\text{HN}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{NCONH}_2$	1.3
$\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RCH}(\text{OH})_2$	1.4
$\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RCOOH} + \text{ArOH}$	1.5
$\text{RSO}_3\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RSO}_3\text{H} + \text{ArOH}$	1.6
$\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HF} + \text{ArOH}$	1.7
(Ar = 2,4-dinitrophenyl)	
$\text{PhCH}_2\text{OCOC}l + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$	1.8
$\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{RSO}_3\text{H} + \text{HCl}$	1.9
(R=Me;Ph)	

Figura1. Reazioni catalizzate dalla α -CAs.

L'attività fosfatasica, precedentemente descritta dalla CA III, è stata recentemente provata essere un artefatto ^[1].

Non è ancora ben chiaro se altre reazioni catalizzate dalla α -CA, come l'idratazione della CO₂, abbiano o meno un significato fisiologico.

E' stata determinata la struttura cristallografica a raggi X per sei α -CAs (isoenzimi CA I-VA, CAXII e CA XIV) ^[1,4] così come per alcuni isoenzimi rappresentativi delle famiglie β - e γ -CA.

Recentemente è stato dimostrato che due isoforme di CA sono associate al cancro, dove esse sono coinvolte nella regolazione del pH e nella progressione del tumore. Recenti approcci nel capire il loro ruolo hanno portato allo sviluppo di nuovi inibitori dell'anidrasi carbonica come agenti terapeutici antitumorali e/o diagnostici.

2. MECCANISMO CATALITICO DELLE ANIDRASI CARBONICHE E LORO INIBIZIONE ^[5]

Il meccanismo catalitico delle CAs è il seguente^[6]: in tutte le classi di enzimi la specie cataliticamente attiva è rappresentata da una specie metallica idrossilata ($L_3-M^{2+}-OH^-$) dell'enzima, la quale agisce come un forte nucleofilo (a pH neutro) sulla molecola di CO₂ all'interno di una tasca idrofobica nelle vicinanze. Questa specie metallica idrossilata si genera dall'acqua coordinata con lo ione metallico, il quale si trova in fondo alla cavità del sito attivo.

Il centro attivo normalmente comprende:

- ioni M(II) in una geometria tetraedrica
- Tre proteine Ligande (L)
- Una molecola di acqua/ione idrossido.

Sono stati osservati anche lo Zn(II) e il Co(II) nelle geometrie di coordinazione trigonale bipyramidale o ottaedrica, per lo meno nelle γ -CAs.

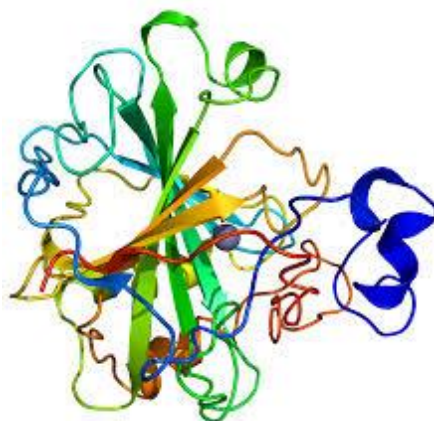


Figura 2. *Struttura delle anidrasi carboniche.*

In molti enzimi lo stadio caratteristico del turnover catalitico è rappresentato dalla formazione della specie metallica idrossilata dal metallo coordinato con l'acqua. Le CAs sono fra i più efficaci catalizzatori conosciuti in natura.

I ligandi ionici metallici sono rappresentati da tre residui d'istidina (His) negli α -, γ -, δ -CAs o una istidina e due residui di cisteina (Cys) nei β - e ζ -CAs. Qualche enzima della classe β ha quattro ligandi zinco-proteina, che sono: un'istidina, due cisteine e un acido aspartico (Asp) coordinato allo Zn(II). Per questi enzimi l'acqua non è coordinata allo ione metallico a valori di pH inferiori a 8, come mostrato da un lavoro di cristallografia del gruppo di Jones sugli enzimi micobatterici Rv3558 e Rv1284^[7]. Tuttavia a valori di pH > 8, un residuo di Arginina (Arg) conservato in tutte le β -CAs studiate finora (appartenenti all'elemento bivalente catalitico) forma un ponte salino con l'acido aspartico (Asp) coordinato allo Zn(II), liberando la quarta posizione di coordinazione dello Zn(II), la quale viene poi occupata dall'ingresso di una molecola di acqua/ione idrossido.

L'inibizione e l'attivazione delle CAs sono processi ben conosciuti: la maggior parte degli inibitori si lega al centro del metallo, mentre gli attivatori si legano all'ingresso della cavità del sito attivo e partecipano allo spostamento dei protoni tra lo ione metallico legato a una molecola di acqua e l'ambiente. Questo porta all'aumento della formazione del metallo idrossilato e quindi della specie cataliticamente attiva dell'enzima^[8,9].

2.1. α -CAs

Per l'attività catalitica è essenziale lo ione metallico (come lo Zn(II)) presente in tutte le α -CAs studiate fino ad ora) ^[1,2].

I dati cristallografici a raggi X della struttura cristallina, hanno dimostrato che lo ione metallico (zinco) è situato nella tasca del sito attivo che è una cavità idrofobica, profonda 15 Å (**Figura 3**), ed è coordinato con tre residui istidinici (His94, His96 e His119), in particolare attraverso i gruppi imidazolici ed una molecola di acqua/ione idrossido ^[1,2].

La geometria di coordinazione è tetraedrica ma distorta.

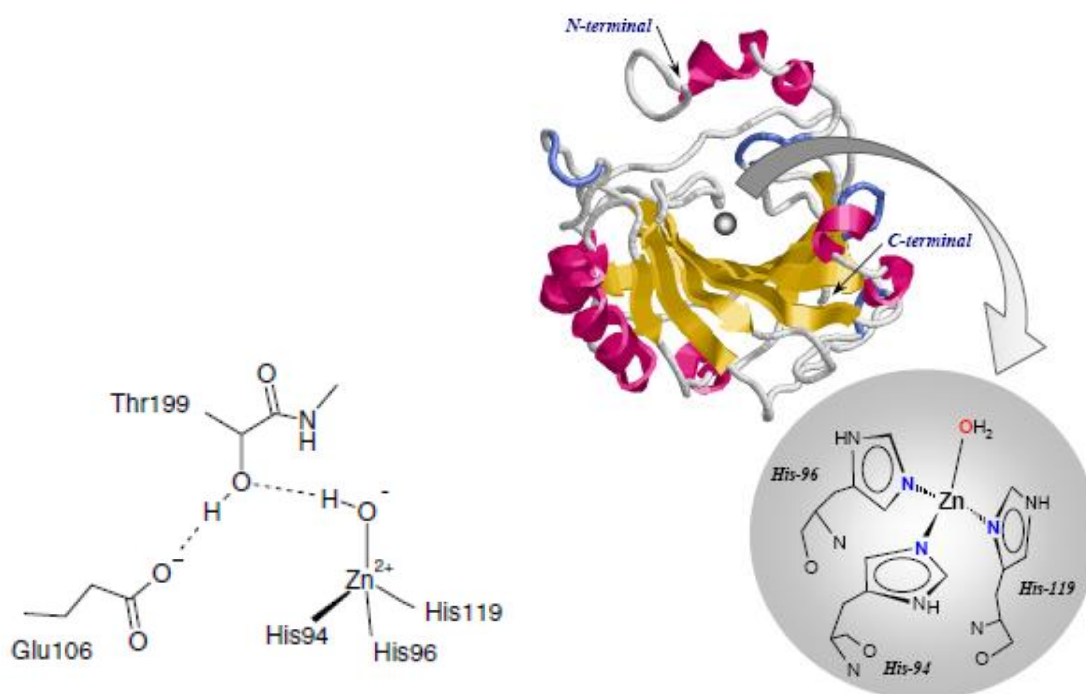


Figura 3. *Struttura delle α -CAs*

L'acqua legata allo ione zinco è anche impegnata nella formazione di un legame a idrogeno con l'ossidrile della Thr199, che a sua volta è collegata con il carbossilato del Glu106; queste interazioni orientano il substrato (CO_2) in una posizione favorevole per l'attacco nucleofilo, incrementando la nucleofilicità della molecola di acqua legata allo zinco (**Figura 4**) ^[1,2].

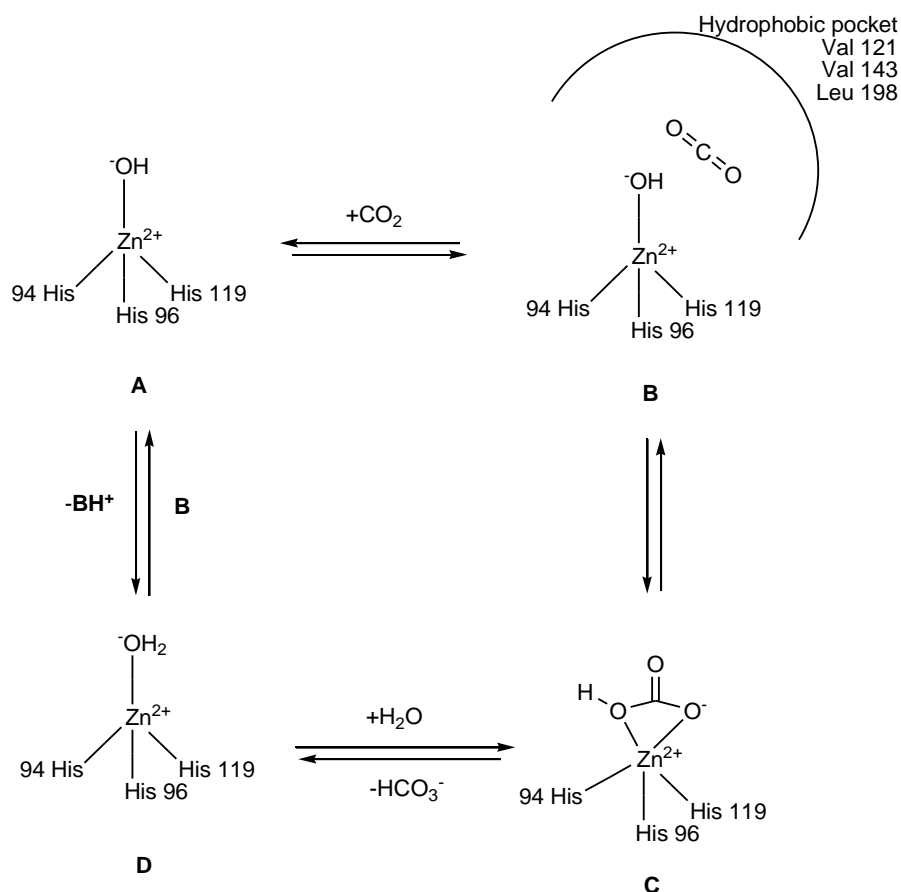
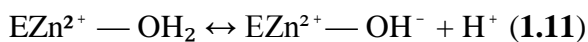


Figura 4. Ruolo della molecola di acqua legata allo zinco.

La forma attiva dell'enzima è la base, con l'idrossido legato allo Zn(II) (**Fig. 4A**). Questo forte nucleofilo attacca la molecola di CO_2 legata in una tasca idrofobica nelle sue vicinanze (il sito di legame del substrato comprende residui di Val121, Val143 e di Leu198 nel caso dell'isoenzima umano CA II) (**Fig. 4B**), portando alla formazione di bicarbonato coordinato allo Zn(II) (**Fig. 4C**).

Lo ione bicarbonato viene poi spiazzato da una molecola d'acqua e liberato in soluzione, portando alla forma acida dell'enzima, con la molecola d'acqua coordinata allo Zn(II) (**Fig. 4D**), che è la forma cataliticamente inattiva^[1,2]. Al fine di rigenerare la base, ha luogo una reazione di trasferimento di un protone dal sito attivo all'ambiente circostante, che può essere sostenuta sia da residui del sito attivo (come l'His64- il protone navetta degli isoenzimi I, II, IV, VII, IX, XII-XIV tra gli altri), che da tamponi presenti nel mezzo.

Il processo può essere rappresentato dalle equazioni (1.10) e (1.11):



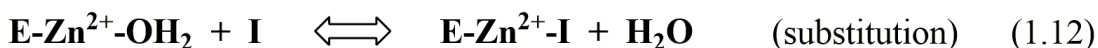
Il passaggio chiave della catalisi è il trasferimento del protone, rappresentato nella seconda reazione, in cui si rigenera la specie Zn-idrossido dell'enzima ^[1,2,10]. Negli isoenzimi cataliticamente molto attivi, come CA II, CA IV, CA VII e CA IX, il processo avviene ad opera di un residuo di istidina posto all'ingresso del sito attivo (His64) e da un gruppo di istidine, che sporgono dal bordo del sito attivo sulla superficie dell'enzima, assicurando così un processo di trasferimento di protoni molto efficace per l'isoenzima CA II ^[10]. Ciò spiega anche perché CA II sia uno degli enzimi più attivi (con una $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e fornisce anche importanti basi per la progettazione di suoi inibitori con applicazioni cliniche ^[1,2,10].

Sono note due principali classi di inibitori CA (CAIs):

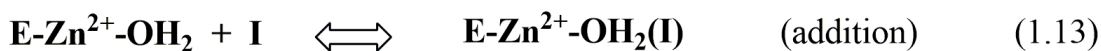
- Gli anioni complessanti il metallo
- Le solfonammidi non sostituite.

Le solfonammidi, che sono i più importanti inibitori delle anidrasi carboniche, legano lo ione Zn(II) con una geometria tetraedrica (**Fig. 5A**), allo stato deprotonato, con l'atomo di azoto della solfonammide coordinato allo Zn(II) e formano un'estesa rete di legami a idrogeno, coinvolgendo residui di Thr199 e di Glu106, che partecipano anche all'ancoraggio della molecola di inibitore allo ione metallico. La parte aromatica/eterociclica dell'inibitore (R) interagisce con residui idrofilici e idrofobici della cavità. Questo meccanismo d'azione è svolto anche dai derivati solfonamidici usati in clinica come: l'acetozolamide, la metazolamide, l'etossizolamide, la diclorofenamide, la dorzolamide e la brinzolamide ^[12].

Gli anioni si possono legare sia con una geometria tetraedrica allo ione metallico (1.12), sia come addotti trigonali-bipiramidali (1.13), come ad esempio l'addotto tiocianato mostrato in **Fig. 5B** ^[11,12].



Tetrahedral adduct



Trigonal-bipyramidal adduct

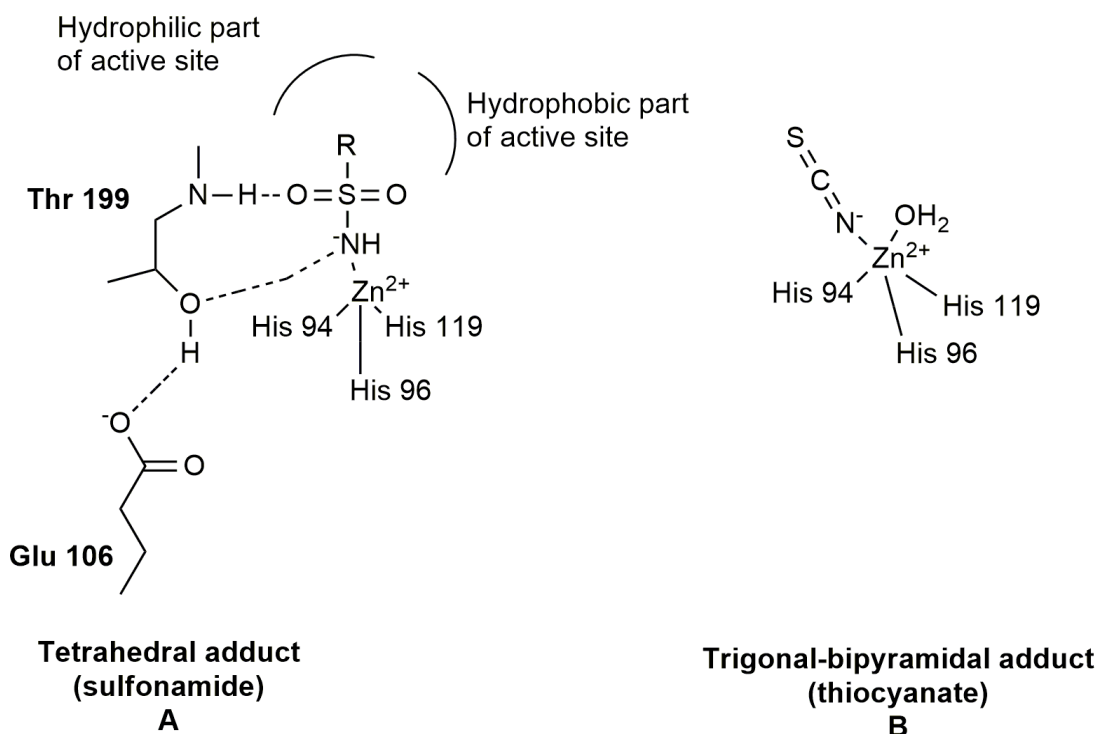


Figura 5. Interazione dei CAIs con lo ione Zn^{2+}

3. UTILIZZO CLINICO GENERALE DEGLI INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA.

Sono stati sviluppati e impiegati clinicamente quattro tipi di solfonammidi CAI come farmaci antiglaucoma: acetazolamide, metazolamide, etossizolamide e diclorofenamide ^[12]. Dai dati della **Tabella 2**, si può osservare che, i composti riportati inibiscono fortemente la maggior parte degli isoenzimi CA (CA I, CA II, CA IV, CA V, CA VII, CA IX, CA XII-XIV) e molti di essi presentano un'affinità nel range del basso nanomolare.

Ad oggi sono stati introdotti in pratica clinica due nuovi farmaci a struttura solfonammidica per uso topico, la dorzolamide e la brinzolamide, risultati potenti inibitori della maggior parte degli isoenzimi α -CA (**Tabella 2**).

Nella **Tabella 2** sono riportati i dati di inibizione verso gli isoenzimi umani cataliticamente attivi, di composti utilizzati in clinica, come le solfonammidi, il topiramato ed il suo derivato sulfamidico (**Figura 6**).

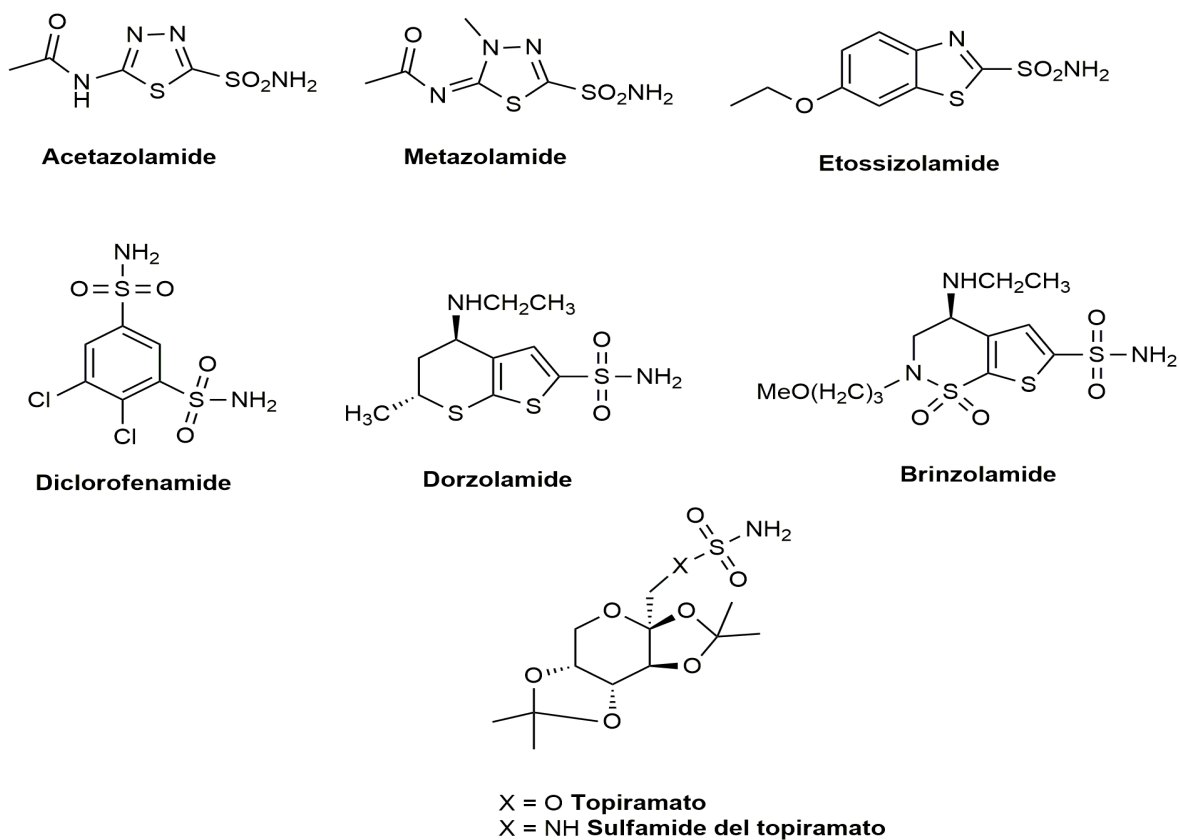


Figura 6. *Composti utilizzati in ambito clinico*

Tabella 2: *Dati di inibizione di composti utilizzati in clinica verso gli isoenzimi umani cataliticamente attivi.*

Composto	Isoenzima K _i (nM)											
	CA I	CA II	CA III	CA IV	CA VA	CA VB	CA VI	CA VII	CA IX	CA XII	CA XIII	CA XIV
Acetazolamide	250	12	3.10	74	63	54	11	2.5	25	5.7	17	41
Metazolamide	50	14	1.10	6200	65	62	10	2.1	27	3.4	19	43
Etossizolamide	25	8	5000	93	25	19	43	0.8	34	22	NT	25
Diclorofenamie	1200	38	NT	15000	630	21	79	26	50	50	23	345
Dorzolamide	50000	9	8000	8500	42	33	10	3.5	52	3.5	18	27
Brinzolamide	45000	3	NT	NT	50	30	0.9	2.8	37	3.0	NT	24
Topiramato	250	10	NT	4900	63	30	45	0.9	58	3.8	47	1460
Topiramato sulfamide	3450	2135	NT	941	32	21	NT	35	4580	1875	30	25

I diversi isoenzimi sono responsabili di differenti risposte biologiche, per questo il loro diverso profilo d'inibizione può spiegare le reali applicazioni cliniche dei CAI come farmaci diuretici, antiglaucoma, antitumorali, anti-obesità e anti-epilettici. Il problema nella progettazione di nuovi CAI riguarda l'elevato numero di isoforme di CA, la loro diffusa localizzazione in molti tessuti e organi (**Tabella 3**) e la mancanza di selettività degli inibitori attualmente disponibili nei confronti dei diversi isoenzimi.

Tabella 3: Localizzazione delle diverse isoforme di CA in tessuti e organi.

Isozyme	K_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	K_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	K_i (nM)	Localizzazione subcellulare	Tessuto/organo di localizzazione
hCA I	2.0×10^5	4.0	5.0×10^7	250	Citosol	Eritrociti, tratto GI
hCA II	1.4×10^6	9.3	1.5×10^3	12	Citosol	Eritrociti, occhi, tratto GI, osteoclasti ossei, rene, polmone, testicoli, cervello
hCA III	1.0×10^6	33.3	3.0×10^5	2.1×10^3	Citosol	Muscolatura scheletrica, adipociti
hCA IV	1.1×10^3	21.5	5.1×10^7	74	Legato alla membrana	Rene, polmone, pancreas, cervello, capillare, colon, muscolo cardiaco
hCA VA	2.9×10^5	10.0	2.9×10^7	63	Mitocondrio	Fegato
hCA VB	9.5×10^5	9.7	9.8×10^7	54	Mitocondrio	Muscolatura scheletrica e cardiaca, pancreas, midollo spinale, rene, tratto GI
hCA VI	3.4×10^5	6.9	4.9×10^7	11	Secreto nella saliva/latte	Ghiandole mammarie e salivari
hCA VII	9.5×10^5	11.4	8.3×10^7	2.5	Citosol	CNS
hCA VIII	ND	ND	ND	ND	Citosol	CNS
hCA IX	3.8×10^5	6.9	5.5×10^7	25	Transmembrana	Tumori, mucosa GI
hCA X	ND	ND	ND	ND	Citosol	CNS
hCA XI	ND	ND	ND	ND	Citosol	CNS
hCA XII	4.2×10^5	12.0	3.5×10^7	5.7	Transmembrana	Rene, intestino, epiteli riproduttivi, occhi, tumori
hCA XIII	1.5×10^5	13.8	1.1×10^7	16	Citosol	Rene, cervello, polmoni, tratto riproduttivo
hCA XIV	3.1×10^3	7.9	3.9×10^7	41	Transmembrana	Rene, cervello Fegato
mCA XV	4.7×10^4	14.2	3.3×10^7	72	Legato alla membrana	Rene

I classici inibitori della CA (CAIs) sono le solfonammidi primarie, $R-SO_2-NH_2$ che, da ormai più di 50 anni, vengono utilizzate clinicamente come diuretici e farmaci antiglaucoma per uso sistemico. Ci sono circa 30 farmaci usati clinicamente (o farmaci in via di sviluppo) che appartengono alla classe delle solfonammidi o dei sulfamati (**Figura 7, 1-25**), che hanno mostrato una significativa attività inibitoria della CA. Oltre all'impiego clinico di questi CAIs come agenti diuretici ed antiglaucoma, sono emerse recentemente le loro proprietà anticonvulsivanti, anti-obesità, antitumorali, antipánico ed anti-infettive [13,14].

I punti critici per la progettazione di nuovi CAIs come agenti terapeutici, riguardano:

- l'elevato numero d'isoforme negli umani (16 CAs, di cui 13 hanno attività catalitica),
- la loro diffusa localizzazione in molti tessuti/organi,
- la mancanza di selettività dell'isoenzima nei confronti degli inibitori solfonamidici/sulfamati attualmente disponibili [13,14].

Tra i derivati **1-25** non ci sono composti che inibiscono selettivamente una specifica isoforma di CA con valori terapeutici. Tuttavia il loro profilo d'inibizione dei 13 isoenzimi di mammiferi è molto variabile e possono essere utilizzati per la progettazione di farmaci di nuova generazione, quali inibitori isoforma-selettivi.

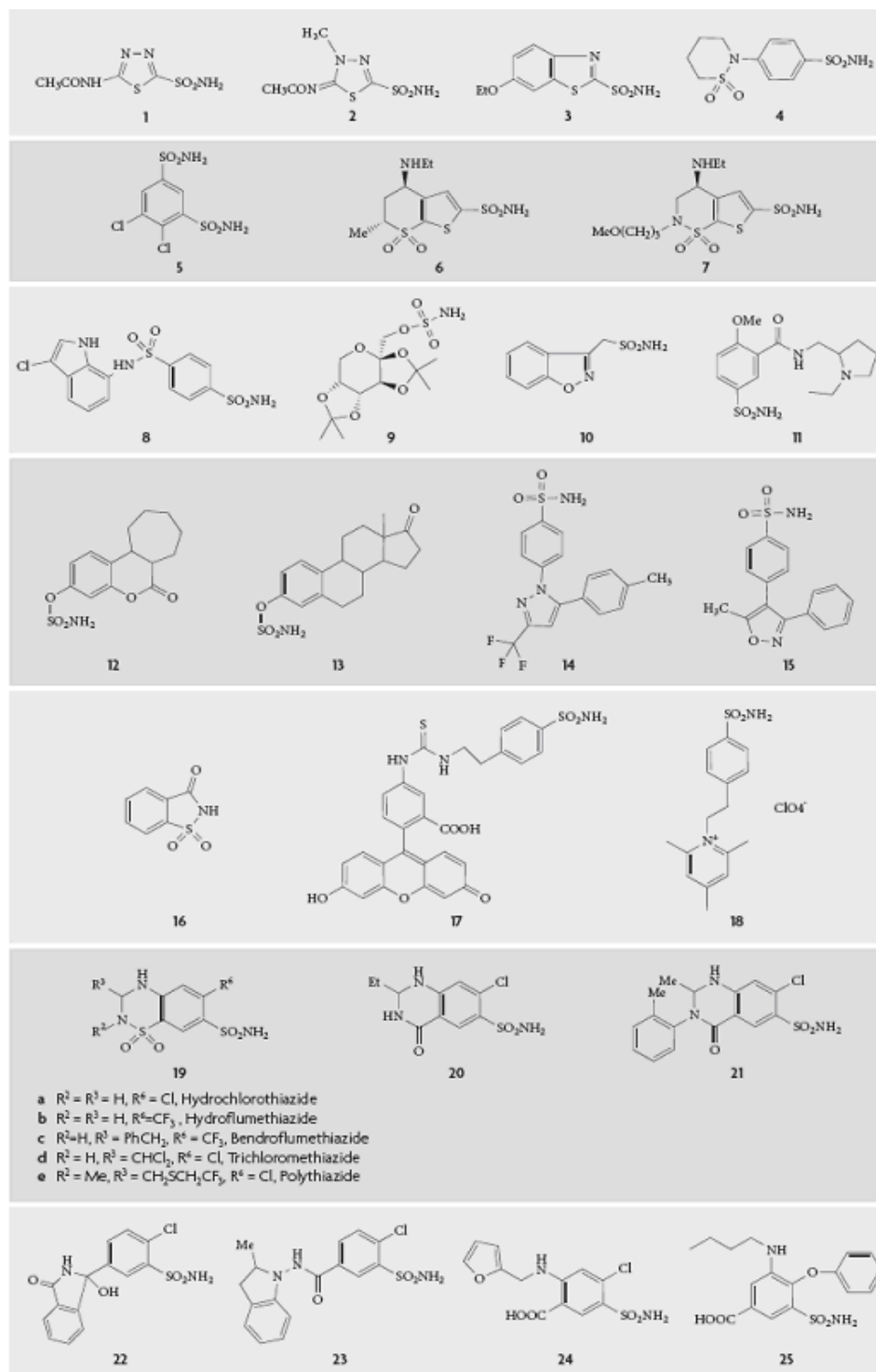


Figura 7. Farmaci usati clinicamente o in via di sviluppo, appartenenti alla classe delle solfonammidi o dei sulfamati, che hanno dimostrato attività inibitoria della CA.

Gli effetti inibitori dei farmaci riportati in **Figura 7**, verso le isoforme di anidraasi carbonica presenti nei mammiferi di origine umana o di topo, sono mostrati in **Tabella 4**.

Tabella 4: *Effetti inibitori di alcuni farmaci usati clinicamente verso le isoforme presenti nei mammiferi CA I-XIV, di origine umana o di topo.*

	K_i (nm) Isozyme (h= human, m=mouse)											
	hCA I	hCA II	hCA III	hCA IV	hCA VA	hCA VB	hCA VI	hCA VII	hCA IX	hCA XII	mCA XIII	hCA XIV
1	250	12	2x10 ⁵	74	63	54	11	2,5	25	5,7	17	41
2	50	14	7x10 ⁵	6.200	65	62	10	2,1	27	3,4	19	43
3	25	8	1x10 ⁶	93	25	19	43	0,8	34	22	50	2,5
4	374	9	6,3x10 ³	95	81	91	134	6	43	56	1.540	1.540
5	1.200	38	6,8x10 ³	15.000	630	21	79	26	50	50	23	345
6	50.000	9	7,7x10 ⁵	8.500	42	33	10	3,5	52	3,5	18	27
7	45.000	3	1,1x10 ³	3.950	50	30	0,9	2,8	37	3,0	10	24
8	31	15	10.400	65	79	23	47	122	24	3,4	11	106
9	250	10	7,8x10 ⁵	4.900	63	30	45	0,9	58	3,8	47	1.460
10	56	35	2,2x10 ³	8.590	20	6.033	89	117	5,1	11.000	430	5.250
11	12.000	40	10.600	6,5x10 ⁵	174	18	0,8	3.630	46	3,9	295	110
12	3.450	21	7,0x10 ²	24	765	720	653	23	34	12	1.050	755
13	37	10	6,5x10 ³	NT	NT	NT	NT	NT	30	7,5	NT	NT
14	50.000	21	7,4x10 ⁴	880	794	93	94	2.170	16	18	98	689
15	54.000	43	7,8x10 ⁴	1.340	912	88	572	3.900	27	13	425	107
16	18.540	5.950	1,0x10 ³	7.920	10.060	7.210	935	10	103	633	12.100	773
17	1.300	45	1,3x10 ⁵	650	134	76	145	18	24	5	76	33
18	4.000	21	3,1x10 ⁵	60	88	70	65	15	14	7	21	13
19°	328	290	7,9x10 ⁵	427	4.225	603	3.655	5.010	367	355	3.885	4.105
20	35.000	1.260	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
21	54.000	2.000	6,1x10 ⁵	216	750	312	1.714	21	320	5,4	15	5.432
22	348	138	1,1x10 ⁴	196	917	9	1.347	28	23	4,5	15	4.130
23	51.900	2.520	2,3x10 ³	213	890	274	1.606	0,23	36	10	13	4.950
24	62	65	3,2x10 ³	564	499	322	245	513	420	261	550	52
25	4.930	6.980	3,4x10 ³	303	700	NT	NT	NT	25,8	212	2.570	250

3.1. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA PER IL TRATTAMENTO DEL GLAUCOMA.

Il glaucoma è una patologia oculare cronica degenerativa, dovuta ad un aumento della pressione oculare (IOP) che causa danni irreversibili al nervo ottico, provocando una perdita progressiva della vista ed eventuale cecità ^[15-17].

In condizioni normali all'interno dell'occhio è presente un liquido definito umore acqueo, che viene prodotto dai corpi ciliari, ricchi di vasi sanguigni. Normalmente alla sua formazione corrisponde un pari deflusso che avviene tramite il canale di Schlemm e piccoli canali collettori che lo convogliano verso il plesso venoso episclerale e ciò permette di mantenere costante la pressione intraoculare. Nel caso in cui il sistema di deflusso non funzioni correttamente, si ha un accumulo di umore acqueo che provoca un aumento della pressione intraoculare.

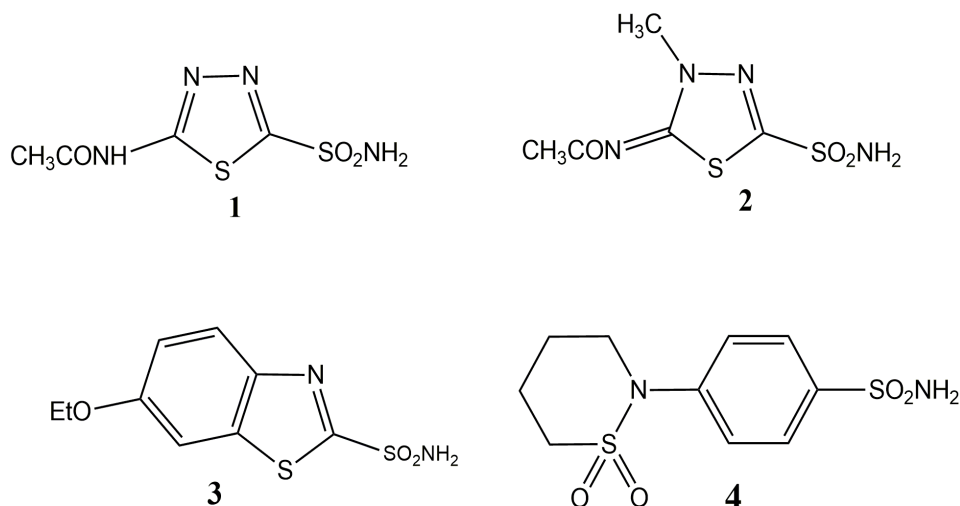
Esistono diversi tipi di glaucoma: il glaucoma primario, a sua volta diviso in glaucoma ad angolo aperto e in glaucoma ad angolo stretto; il glaucoma congenito; il glaucoma secondario.

Studi sulla chimica e sulla dinamica dell'umore acqueo hanno stabilito che il principale costituente della sua secrezione è rappresentato dal bicarbonato di sodio.

Le CAs sono state identificate nell'uvea anteriore dell'occhio, dove hanno dimostrato essere responsabili della secrezione di bicarbonato.

I CAIs rappresentano la terapia principale per il trattamento del glaucoma, in quanto inibiscono l'enzima del processo ciliare (l'isoenzima CA II solfonammido sensibile, **Tabella 4**) e determinano quindi una riduzione della secrezione di bicarbonato e di umore acqueo, causando il 25-30% di riduzione della pressione intraoculare ^[15].

L'acetazolamide (**1**) per via sistemica, la metazolamide (**2**), l'etossizolamide (**3**) o la diclorofenamide (**4**) sono molto utilizzate per il trattamento di questo disturbo.



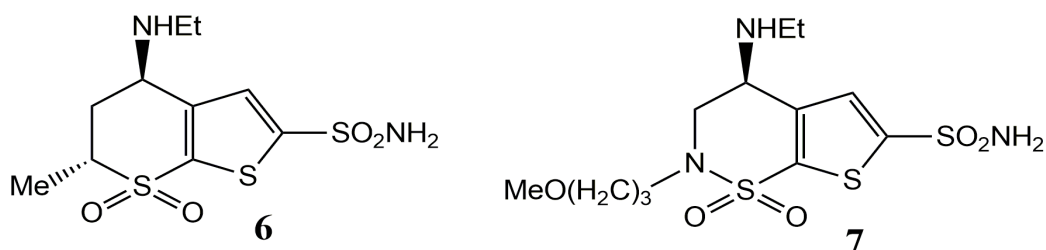
Uno dei farmaci più utilizzati è l'Acetazolamide (**1**, il cui nome commerciale è Diamox®), la quale spesso viene somministrata per lunghi periodi in quanto riduce notevolmente la pressione intraoculare; possiede inoltre minima tossicità e proprietà farmacocinetiche ideali.

La somministrazione delle solfonammidi per via sistemica porta all'inibizione non specifica delle CAs espresse a livello dei processi ciliari degli occhi (ad esempio la CA II, IV e XII), in quanto le CAs sono espresse in maniera ubiquitaria nei vertebrati.

La mancanza di selettività causa effetti indesiderati come torpore e formicolio delle estremità, sapore metallico, depressione, fatica, malessere, perdita di peso, diminuzione della libido, irritazione gastrointestinale, acidosi metabolica, calcoli renali e miopia transitoria.

Lo sviluppo di solfonammidi solubili in acqua come inibitori della anidasi carbonica, da utilizzare sottoforma di gocce oculari, iniziò nel 1990 e dal 1995 il primo agente farmacologico, la Dorzolamide (**6**), è stato lanciato dalla Merck con il nome commerciale di Trusopt®^[6].

Un secondo composto strutturalmente simile, la Brinzolamide (**7**), introdotto dalla Alcon con il nome commerciale di Azopt®^[6], è stato approvato per il trattamento topico del glaucoma in associazione a β -bloccanti come il Timololo (Timoptol®) e in associazione ad analoghi della PGF2 α ^[18], al latanoprost (Xalatan®) e al travoprost (Travatan®).



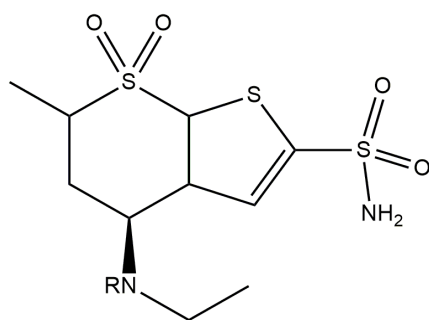
La Dorzolamide e la Brinzolamide sono potenti inibitori dell'anidrasi carbonica solubili in acqua, inoltre sono sufficientemente liposolubili per penetrare la cornea e quindi possono essere somministrati rispettivamente per via topica come sali (a un pH di 5.5) o come basi libere. Questi due farmaci risultano essere efficaci nel ridurre la pressione intraoculare e mostrano minori effetti collaterali rispetto ai farmaci utilizzati per via sistemica.

Gli effetti collaterali osservati per questi due farmaci sono probabilmente dovuti al pH acido della soluzione oculare di Dorzolamide e includono: dolore, bruciore e arrossamento degli occhi, visione sfuocata e prurito. E' stato riscontrato anche un sapore amaro con entrambi i farmaci CAIs sia in seguito ad uso sistemico che topico, probabilmente causato dall'accumulo di farmaco a livello oculare che defluisce nell'orofaringe e che inibisce le anidrasi carboniche presenti nella saliva (CA VI) e nelle papille gustative (CA II e CA VI) con il conseguente accumulo di bicarbonato.

Questi composti vengono utilizzati con lo scopo di controllare il flusso di umore acqueo e quindi mantenere sottocontrollo la pressione intraoculare nei pazienti con glaucoma ^[19].

Nuovi efficaci inibitori dell'anidrasi carbonica quali potenziali agenti antiglaucoma sono ancora in via di sviluppo ^[17].

E' stato proposto un altro approccio per ottenere inibitori delle anidrasi carboniche (CAIs) antiglaucoma ^[19] che consiste nell'inserimento, sullo scheletro della Dorzolamide (**6**), di esteri nitrici, portando così a composti del tipo **26**.



26

- a R= CO(CH₂)₃ONO₂ (NCX 274)
- b R= CO-p-(C₆H₄)-CH₂ONO₂ (NCX 265)
- c R= COO(CH₂)₃ONO₂ (NCX 278)
- d R= COO(CH₂)₄ONO₂ (NCX 245)
- e R= COOCH₂CH(ONO₂)CH₂ONO₂ (NCX 201)

Alcuni di questi composti hanno mostrato un'elevata potenza ed efficacia NO-mediata, come provato dal loro effetto rilasciante vascolare sull'anello aortico dei conigli pre-contratto da metoxamina; inoltre hanno dimostrato di poter abbassare fortemente la pressione intraoculare *in vivo* nei conigli normotesi ^[19].

Sono stati preparati dendrimeri legati a diverse porzioni benzensulfonammidiche che mostrano un aumento dell'inibizione dell'anidrasi carbonica, in particolare per le isoforme CA II e CA XII coinvolte nel glaucoma.

È stato dimostrato che la somministrazione cronica di tali dendrimeri per 5 giorni, ha portato ad una riduzione molto più efficiente della pressione intraoculare rispetto all'utilizzo di Dorzolamide. ^[20].

Gli inibitori delle anidrasi carboniche possono essere utilizzati anche per il trattamento dell'edema maculare, patologia multifattoriale che colpisce la zona centrale della retina, detta macula. E' ad andamento progressivo e può portare alla perdita completa ed irreversibile della visione centrale.

Efficaci nel trattamento dell'edema maculare sono: l'acetazolamide (sale sodico), la dorzolamide e la brinzolamide ^[16].

La scomparsa dell'edema ed il miglioramento della vista sono indipendenti dall'attività ipotensiva della solfonammide, ma sembra essere dovuta agli effetti diretti sulla circolazione nella retina. L'acetazolamide, la dorzolamide o la brinzolamide agiscono, probabilmente, come vasodilatatori locali, migliorando il flusso di sangue a livello dell'occhio e di conseguenza eliminando i prodotti di scarto metabolico.

La visione viene notevolmente migliorata, in seguito al trattamento con questi composti nelle fasi iniziali del disturbo ^[16].

La retinopatia diabetica proliferativa e l'edema maculare diabetico rappresentano le principali cause della perdita della vista e attualmente non sono presenti trattamenti farmacologici risolutivi. Però è stato dimostrato che l'inibizione della CA I (isoenzima citosolico che media la permeabilità retinale emorragica e quella vascolare cerebrale attraverso l'attivazione della precallieina e la generazione di una serina proteasi altamente attiva, che è il fattore XIIa ^[21]) può essere un bersaglio terapeutico per il trattamento di queste patologie. Attualmente sono disponibili potenti inibitori della CA I.

Alcune isoforme associate alla membrana, come la CAIV, IX e la XII, sono anche considerate possibili bersagli delle solfonammidi antiglaucoma ^[22-24].

L'isoenzima bovino CA IV si è dimostrato sensibile all'inibizione da parte di molte solfonammidi e sulfamati, con una K_i nel range del basso nanomolare ^[22]. La corrispondente isoforma umana, CA IV, però mostra un diverso funzionamento nei confronti di qualche farmaco: l'acetazolamide, l'etossizolamide e il sultame agiscono come potenti inibitori, mentre altri agenti antiglaucoma, come la metazolamide, la diclorofenamide, la dorzolamide e la brinzolamide, agiscono come deboli inibitori (**Tabella 4**); ciò suggerisce che è improbabile che la CA IV sia coinvolta nella secrezione dell'umore acqueo, dato che viene inibito debolmente dalla maggior parte delle solfonammidi antiglaucoma.

Tuttavia, la CA XII (ma non la CA IX) ha recentemente mostrato di essere altamente espressa negli occhi di pazienti con glaucoma e probabilmente gioca un ruolo importante nell'aumento della pressione intraoculare caratteristica del disturbo ^[24].

Successivamente è stato dimostrato che la CA XII viene altamente inibita da tutte le solfonammidi antiglaucoma usate clinicamente (**Tabella 4**) e dunque, questa è probabilmente l'isoforma di membrana coinvolta nel glaucoma, che viene bersagliata da questi agenti farmacologici.

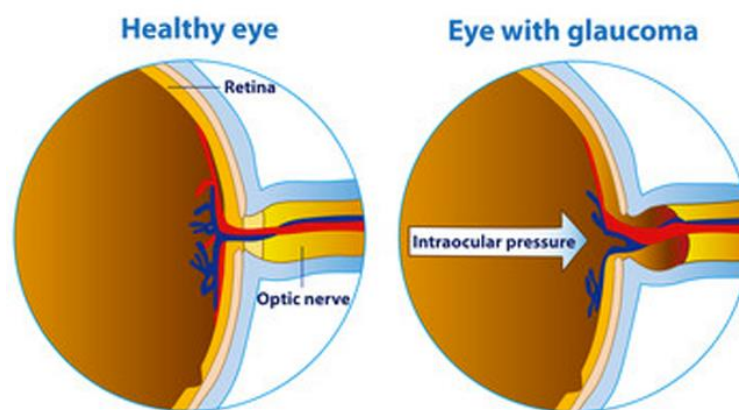


Figura 8. Aumento della pressione intraoculare

3.2. INIBITORI DELLA ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI COME POTENZIALI FARMACI ANTITUMORALI ^[24]

Una caratteristica importante dei tumori è l'ipossia ^[26]. Il tumore, quindi, è caratterizzato da un inadeguato rifornimento di ossigeno. L'ipossia nei tumori sembra essere associata alla propagazione del tumore, alla sua trasformazione in maligno, alla sua eventuale resistenza alla chemioterapia ed alla radioterapia.

L'ipossia regola l'espressione di differenti geni, incluso l'isoenzima CA IX, attraverso la cascata del fattore d'ipossia inducibile 1 (HIF1).

L'espressione della CA IX è sovra-regolata dall'ipossia e sotto-regolata dalla proteina soppressitrice di tumori *wild type* di Von Hippel-Lindau (pVHL) (**Figura 9**) ^[26].

In alcune cellule cancerogene, il gene VHL risulta essere mutato e ciò causa una forte sovra-espressione della CA IX (fino a 150 ripiegamenti) come conseguenza dell'attivazione dell'HIF costitutiva. La sua sovraespressione è correlata con una prognosi sfavorevole in un'ampia varietà di neoplasie: come il carcinoma dell'esofago, del polmone, e quello mammario. L'ipossia, attraverso la cascata dell'HIF, porta ad un'alta sovra-espressione della CA IX in molti tumori. Ciò causa un'alterazione del pH dei tumori ipossici, che infatti assumono un pH acido con valori intorno a 6, in contrasto con i normali tessuti, i quali hanno un pH caratteristico con valori intorno a 7.4.

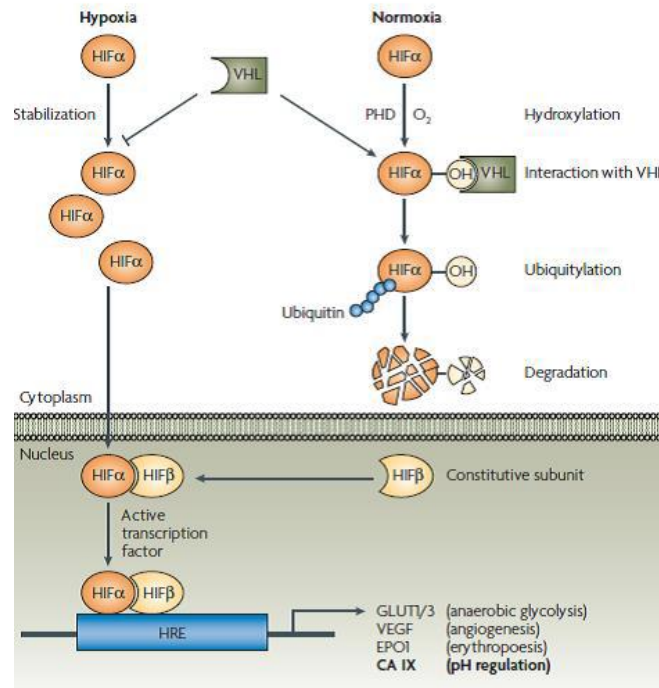


Figura 9. Regolazione dell'espressione della CA IX.

La CA IX appartiene alla famiglia delle α -CAs umane molto attive e le sue proprietà catalitiche della reazione di idratazione della CO₂ sono paragonabili a quelle del catalizzatore CA II altamente evoluto.

Attualmente la struttura a raggi X della CA IX non è ancora disponibile, quindi è stata utilizzata la struttura della CA II per comprendere le caratteristiche di inibizione della CA IX.

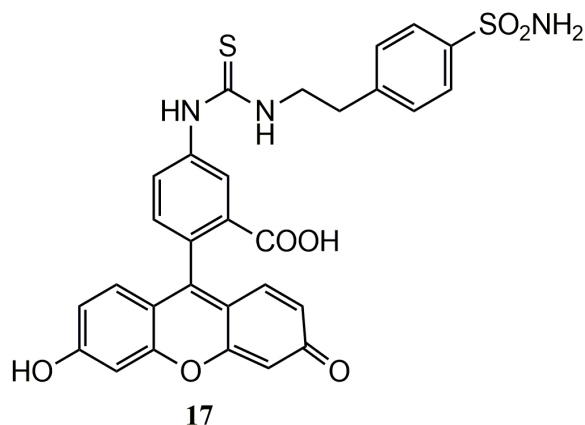
Come per tutte le α -CAs, la CA IX è sensibile all'inibizione da parte di anioni, solfonammidi e sulfamati. Gli inibitori si coordinano direttamente con lo ione zinco dentro la cavità del sito attivo e partecipano a varie interazioni favorevoli con residui amminoacidici, situati nel mezzo idrofobico e idrofilico del sito attivo.

Alcuni anni fa sono stati identificati molti inibitori della CA IX con concentrazioni del basso nanomolare (**Tabella 4**)^[27-29].

Studi successivi hanno messo in evidenza anche composti che non permeano la membrana e che quindi inibiscono in modo specifico la CA IX *in vivo* o composti che agiscono come inibitori duali CA IX-COX2.

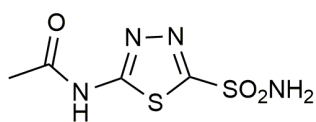
Sia le solfonammidi eterocicliche che aromatiche, come anche le solfonammidi/sulfamati/sulfammidi alifatiche, possiedono un'attività inibitoria nell'ordine del basso nanomolare per le CA IX che sono state scoperte finora.

La maggior parte degli inibitori delle anidrasi carboniche utilizzate per comprendere la funzione di questa proteina *in vivo*, sono stati i composti fluorescenti del tipo **17**.

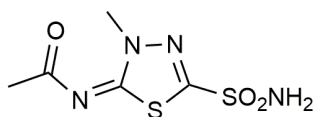


I composti solfonamidici aromatici (classici inibitori delle CAs) hanno mostrato di:

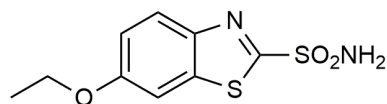
- invertire l'effetto dell'acidificazione tumorale (composto A)
- inibire la crescita delle cellule cancerose con valori di IC_{50} (corrispondenti alla molarità degli inibitori che producono il 50 % di inibizione della crescita delle cellule tumorali dopo 48 ore di esposizione al farmaco) nell'intervallo del micromolare (metazolamide, etossizolamide, indisulam, composti B-D)
- sopprimere l'invasione del tumore mediata dalle CAs associate al cancro (acetazolamide)



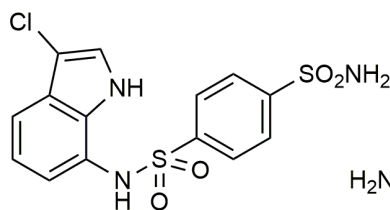
Acetazolamide



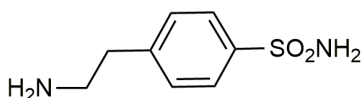
Metazolamide



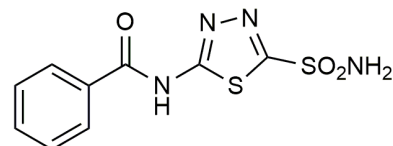
Etossizolamide



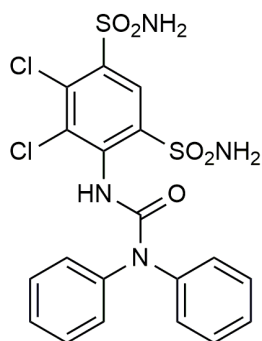
Indisulam



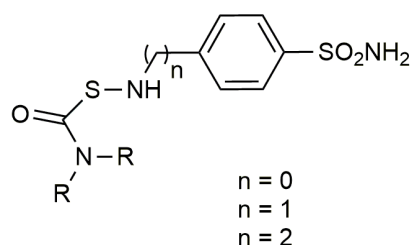
A



B



C



D

Teicher e colleghi hanno riportato che l'acetazolamide, se somministrata da sola, riduce la crescita del tumore mentre quando somministrata in combinazione con diversi agenti chemioterapici, ritarda il suo sviluppo ^[30].

L'indisulam (**8**), derivato solfonamidico (originariamente chiamato E7070), ha recentemente mostrato di agire come inibitore nell'ordine del nanomolare della CA IX (**Tabella 4**) ^[31].

L'indisulam è attualmente in fase II di sperimentazione clinica e il suo meccanismo d'azione ancora non è ben chiaro. E' comunque noto che è coinvolto nella perturbazione del ciclo cellulare nelle fasi G1 e/o G2, nella sottoregolazione delle cicline, nella riduzione dell'attività della chinasi 2 ciclina dipendente (CDK2), nell'inibizione della fosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRb), nell'espressione differenziata di molecole che partecipano all'adesione cellulare, nella risposta di segnale e immunitaria, in aggiunta alle

sue proprietà inibitorie nei confronti della CA IX. Ha inoltre dimostrato di avere un'efficacia nel trattamento dei tumori solidi.

Tutti gli inibitori della CA non bersagliano selettivamente le CA IX e XII, perciò essi sono anche capaci di inibire altri isoenzimi della CA (ad esempio la CA I e la CA II) che hanno rilevanza fisiologica.

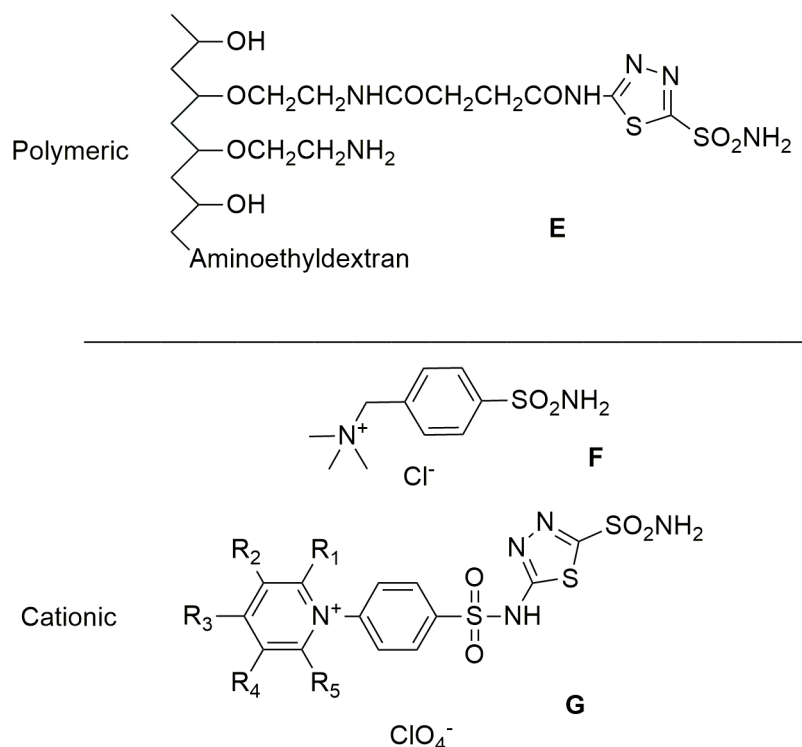
Perciò, negli ultimi anni, sono state proposte delle strategie per ottenere composti che bersaglino in modo specifico le isoforme associate ai tumori.

Gli isoenzimi CA IX e XII hanno delle caratteristiche che le distinguono dalle CA I e II. Sono fisiologicamente denominate isoenzimi IX e XII e sono proteine transmembrana che orientano il loro dominio catalitico CA fuori dalla cellula, mentre gli isoenzimi I e II sono proteine solubili localizzate nel citosol.

Quindi cercare di ottenere solfonammidi aromatiche con una minore capacità di diffondere attraverso la membrana lipidica, è una possibile strategia per ottenere specificità nei confronti degli isoenzimi associati al cancro.

Il primo approccio per indurre l'impermeabilità della membrana agli inibitori della CA, è stato quello di progettare inibitori polimerici ad alto PM (**composto E**). Tuttavia, gli effetti in vivo di questi composti sono stati deludenti a causa di problemi connessi ai polimeri (reazioni allergiche o problemi di biodisponibilità).

Si è pensato, allora, di sviluppare solfonammidi cationiche, ottenute facendo reagire solfonammidi eterocicliche aromatiche contenenti gruppi $-NH_2$ liberi con sali di pirilio, per ottenere derivati pirimidinici. I composti derivati da **G** hanno mostrato una K_i nel range del basso nanomolare per la CA IX associata ai tumori (K_i nell'intervallo di 3-5 nM).



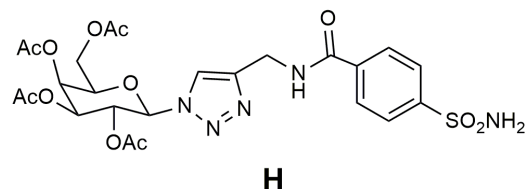
Studi successivi *ex vivo* hanno mostrato che tali composti possono discriminare tra l'isoenzima CA legato alla membrana e quello del citosol.

In vivo questi composti, non erano però, in grado di attraversare la membrana plasmatica, quindi, poiché tali composti non inibiscono le CAs intracellulari, possono mostrare minori effetti collaterali confrontandoli con i composti attualmente disponibili (come l'acetazolamide), che inibiscono indiscriminatamente tutte le CAs.

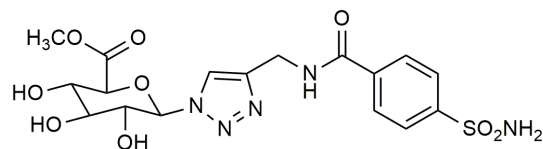
Com'è ben noto, i carboidrati non possono diffondere attraverso la membrana e per questo motivo Wilkinson e colleghi hanno preparato una serie di solfonammidi benzeniche glucoconjugate attaccando, attraverso *click-tailing*, funzioni zuccherine al farmacoforo costituito dalle classiche solfonammidi aromatiche ad alta affinità (Ar-SO₂-NH₂)^[32].

Due composti (**H**, **I**) si sono rivelati molto attivi e selettivi verso la CA IX. Le code zuccherine hanno mostrato di essere fondamentali per ottenere composti selettivi nei confronti degli isoenzimi della CA. Poiché l'ipossia è una caratteristica di molti tumori solidi, un'altra strategia per colpire gli isoenzimi associati ai tumori, è la progettazione di inibitori della CA bioriduttivi, ipossia-attivabili (**composti L e M**).

Solfonammidi benzeniche
glucoconiugate

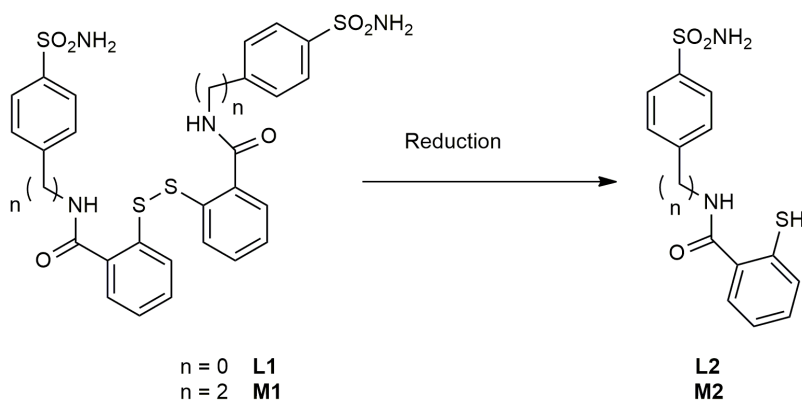


H



I

Hypoxia-activatable



La strategia è quella di utilizzare le condizioni di riduzione presenti in tali tumori, dove l'ossigeno è meno dell'1%, per convertire un profarmaco inattivo in un inibitore delle anidrasi carboniche. Questo tipo di riduzione, può anche essere mediata dalla proteina riducente tioredoxina-1, che è stata trovata ad alte concentrazioni in molti tipi di tumore umano.

Quindi, sono stati sintetizzati derivati disolfurici delle solfonammidi eterocicliche aromatiche da De Simone e colleghi ^[33]. Inizialmente, tali solfonammidi contenenti disolfuri erano molto ingombranti e quindi incapaci di legarsi all'interno dello spazio ristretto del sito attivo della CA.

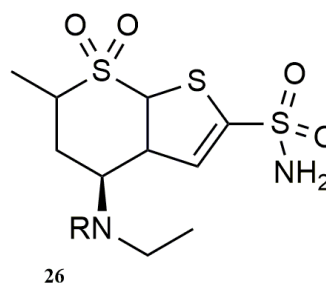
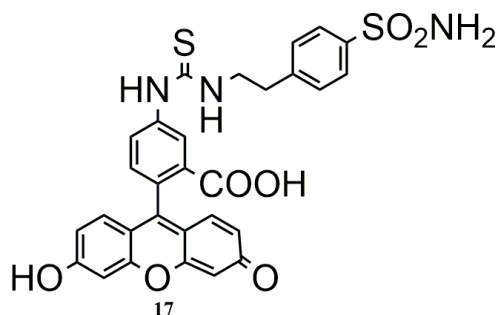
La bioriduzione nei tumori ipossici di tali solfonammidi dimeriche dovrebbe generare tioli, che quindi sono molto meno voluminosi e dovrebbero legarsi al sito attivo degli enzimi associati al cancro, presenti nei tumori ipossici.

3.3. INIBITORI DELLA ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI NELLA DIGNOSI DEL CANCRO ^[25].

Essendo, le CAs IX e XII, espresse nelle cellule cancerose, potrebbero essere utilizzate come *marker* per una vasta gamma di tumori ipossici. Quindi alcune solfonammidi fluorescenti sono state progettate per l'*imaging* e la successiva diagnosi di tumori ipossici. Uno dei più importanti composti sviluppati fino ad oggi è il derivato **17** (4-sulfamoilfeniletitioureido) fluoresceina, preparato attraverso la reazione della fluoresceina tiocianato (FITC) con una omosulfanilammide aromatica ammino sostituita. E' stato dimostrato che il composto **17** lega solo il tessuto tumorale ipossico, sovraesprimendo gli isoenzimi associati al cancro, quindi è molto utile per evidenziare l'*imaging* di questo tipo di cancro.

Questo composto presenta una K_i verso la CA IX di 24 nM e mostra proprietà di impermeabilità alla membrana, valutata attraverso un modello *in vivo* delle membrane delle cellule rosse del sangue.

Per quanto riguarda il composto **26**, questo è stato capace di ridurre l'acidificazione extracellulare delle cellule CA IX del rene canino Madin-Darby (MDCK-CA IX) nell'ipossia, ed il loro effetto sul pH extracellulare normossico è risultato trascurabile. Attualmente, è stato sviluppato come strumento diagnostico, negli studi clinici, per l'*imaging* di tumori ipossici.



3.4. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI COME DIURETICI.

I farmaci diuretici incrementano il volume delle urine, attraverso la riduzione, più o meno spinta, del riassorbimento di sodio ed acqua in vari livelli del nefrone. Hanno proprietà antiipertensive, riducono la volemia e la pressione sanguigna.

I diuretici si dividono in varie classi :

- diuretici drastici
- risparmiatori di potassio
- inibitori dell'anidasi carbonica
- diuretici triazidici

Le anidasi carboniche sono presenti in maniera abbondante a livello dei reni e le isoforme presenti in questo organo giocano un ruolo cruciale in almeno tre processi fisiologici

(Figura 10):

- il bilancio omeostatico acido-base (con la secrezione e l'escrezione di protoni, che si formano dalla reazione di idratazione della CO_2 catalizzata da questi enzimi)
- il processo di riassorbimento del bicarbonato
- l'escrezione di NH_4^+ .

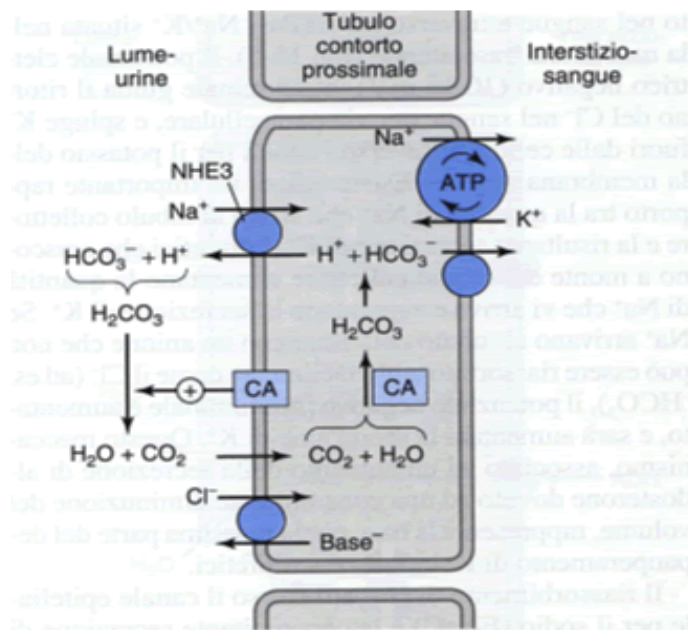


Figura 10. Ruolo della CA nel rene.

L'acetazolamide (**1**) è stato il primo diuretico non-mercuriale ad essere utilizzato clinicamente nel 1956 ^[12].

Tale composto rappresenta il prototipo di una classe di agenti farmacologici con uso terapeutico limitato, ma che ha un importante ruolo nello sviluppo delle basi della fisiologia e farmacologia renale. Inoltre ha un ruolo predominante nella progettazione della maggior parte degli agenti diuretici attualmente usati, come la tiazide ed i diuretici high-ceiling.

L'inibizione dell'anidrasi carbonica comporta una diminuzione dello scambio tra ioni idrogeno e ioni sodio nel tubulo renale. Gli ioni sodio, insieme a ioni bicarbonato e ioni potassio, vengono escreti con conseguente effetto diuretico.

Quindi la somministrazione prolungata degli inibitori dell'anidrasi carbonica, come l'acetazolamide, provoca un aumento del volume delle urine che diventano più alcaline.

L'inibizione dell'anidrasi carbonica a livello del tubulo prossimale, porta all'inibizione della secrezione di H^+ in questo segmento del nefrone. L'inibizione degli enzimi citosolici (CA II) e di membrana (CA IV, XII e XIV) sembra essere coinvolta negli effetti diuretici delle solfonammidi. Il risultato finale è un aumento della diuresi.

Molti altri diuretici, come le benzotiadiazine (**19 a-e**; per esempio la clorotiazide e l'idroclorotiazide); quinetazone (**20**); metolazone (**21**); clortalidone (**22**); indapamide (**23**); furosemide (**24**) e bumetanide (**25**) agiscono come inibitori dell'anidrasi carbonica con differente efficacia (**Figura 11**). Molti di essi hanno solfonammidi primarie non sostituite come gruppi che legano lo zinco ^[34].

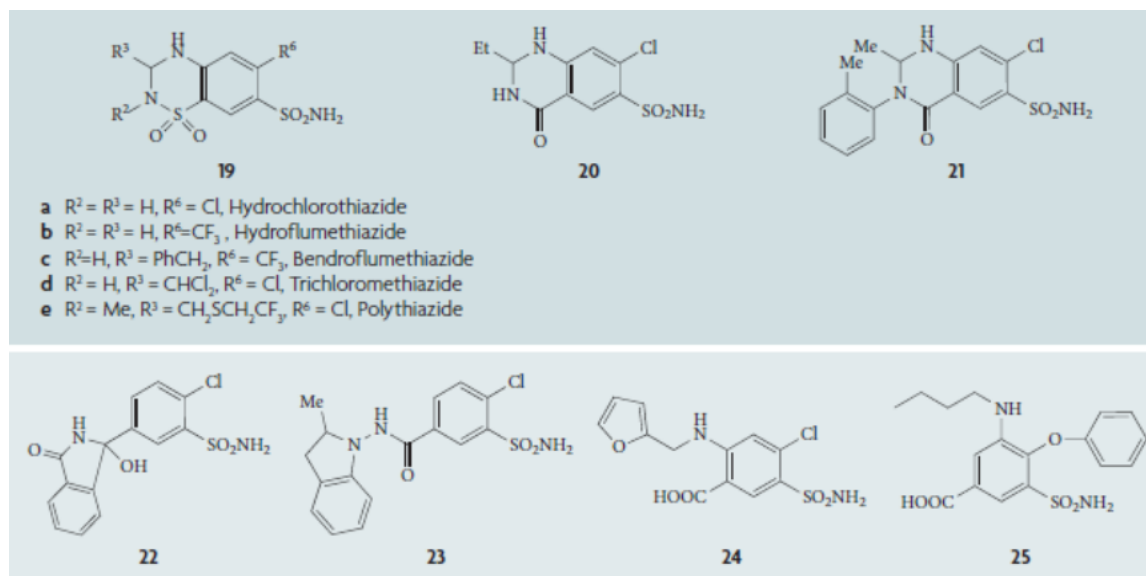


Figura 11. *Diuretici inibitori della CA.*

3.5. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI NEL TRATTAMENTO DELL'OSTEOPOROSI.

L'isoforma CA II altamente attiva è molto abbondante nelle ossa ed è presente solo a livello degli osteoclasti a concentrazioni dello stesso ordine di grandezza di quello presente a livello dei reni.

Il ruolo di questo enzima è quello di fornire ioni idrogeno, provenienti dall'idratazione della CO_2 , ad una pompa protonica ATP-dipendente, la quale li utilizza nella mobilitazione del calcio dalle ossa. Queste attività sono richieste per la dissoluzione della matrice inorganica, che precede la rimozione enzimatica della matrice organica dalle ossa. Per valutare il ruolo fisiologico delle anidrasi carboniche di membrana negli osteoclasti, sono stati usati nuovi inibitori della CA, strutturalmente correlati al composto **18**, che non permeano la membrana ^[35].

In una coltura di osteoclasti di ratti, che sono stati esposti ad una bassa concentrazione di inibitore, è stato osservato un aumentato numero di osteoclasti ed un'attività di

riassorbimento osseo. Il trattamento con gli inibitori disturba anche l'acidificazione intracellulare degli osteoclasti.

Gli isoenzimi di membrana CAIV e CA XIV sono espressi negli osteoclasti *in vivo* e *in vitro*.

Successivi esperimenti sugli inibitori hanno fornito nuove evidenze che annullano l'ipotesi che la regolazione del pH intracellulare negli osteoclasti può coinvolgere il trasporto di metaboloni e che potrebbe essere possibile l'utilizzo di alcuni inibitori nella progettazione di nuove terapie anti-osteoporosi ^[35].

3.6. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI COME POTENZIALI FARMACI ANTI-OBESITÀ.

Tra le isoforme α -CA trovate negli animali, gli isoenzimi CA VA e VB, sono presenti nei mitocondri (**Tabella 3**).

Questi isoenzimi sono coinvolti in differenti processi biosintetici, come l'ureogenesi, la gluconeogenesi e la lipogenesi nei vertebrati (per esempio nei roditori) e negli invertebrati (per esempio nelle cavallette) ^[36].

L'approvvigionamento di sufficiente bicarbonato (che rappresenta il substrato) in diversi processi biosintetici che coinvolgono la piruvato carbossilasi (PC), l'acetil-Co-A carbossilasi (ACC) e la carbamoil-fosfato sintetasi I e II, viene assicurato principalmente dalla reazione catalitica che coinvolge gli isoenzimi mitocondriali CA VA e CA VB, probabilmente aiutati dall'elevata attività dell'isoenzima citosolico CA II (**Figura 12**) ^[36].

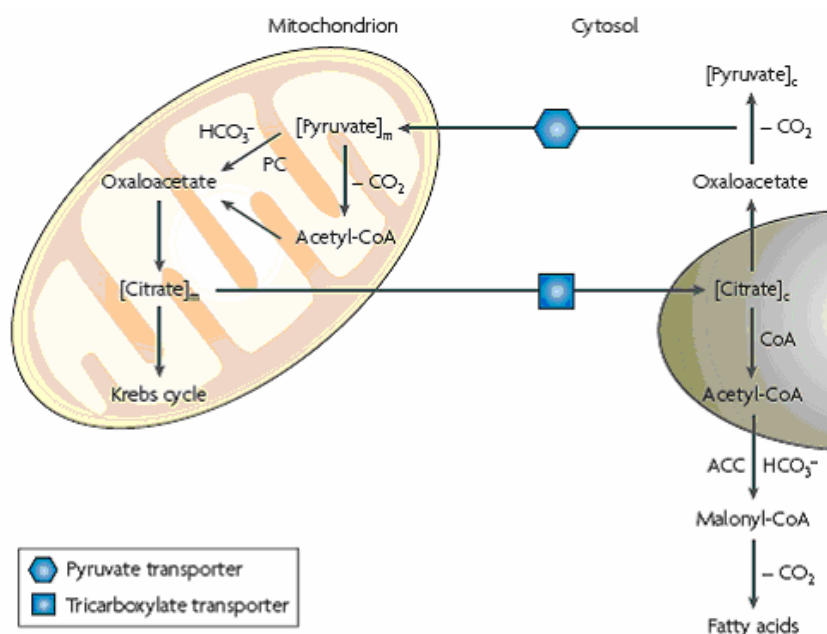


Figura 12. Sintesi del substrato, il bicarbonato, a livello mitocondriale.

Diversi studi hanno evidenziato che gli inibitori delle anidrasi carboniche hanno un potenziale come farmaci anti-obesità, che può essere dovuto ai loro effetti sugli isoenzimi CA.

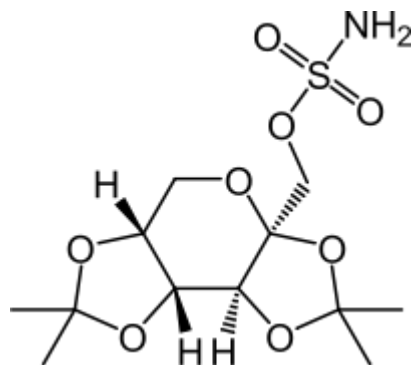
Il topiramato (**9**) è un farmaco anti-epilettico che possiede potenti effetti anticonvulsivanti con un meccanismo d'azione multifattoriale: il blocco dei canali al sodio e dei recettori cainato/AMPA (acido α -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo-propionico), la ritenzione di CO_2 secondaria all'inibizione dei globuli rossi del sangue e degli isoenzimi CA del cervello, come l'aumento del sistema di trasmissione GABA A (acido- γ -amminobutirrico)-ergico ^[37].

Un effetto collaterale di questo farmaco, osservato in pazienti obesi, era la perdita di peso corporeo, anche se nessuna spiegazione farmacologica di tale fenomeno è stata fornita ^[38].

Il topiramato ha inoltre dimostrato di ridurre le calorie e i grassi nei ratti obesi e in ratti Zucker.

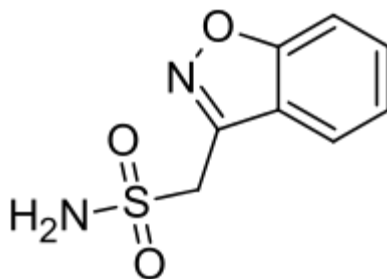
È stato anche dimostrato che il topiramato è un potente inibitore di differenti isoenzimi CA, come la II, VA, VB, VI, VII, XII e XIII (**Tabella 4**), ed è stata determinata la struttura cristallina a raggi X del suo complesso con la CA II umana, rivelando le interazioni molecolari che spiegano l'elevata affinità di questo composto per il sito attivo della CA ^[37].

Poiché il topiramato agisce anche come efficace inibitore degli isoenzimi CA VA e VB mitocondriali umani, l'inibizione di entrambi gli isoenzimi CA mitocondriali e citosolici coinvolti nella lipogenesi, può costituire un nuovo approccio per controllare la perdita di peso ^[36,38].



9

La zonisamide (**10**) è un altro farmaco anti-epilettico usato come terapia aggiuntiva nei parziali attacchi refrattari. Tale composto ha molteplici meccanismi d'azione e mostra un ampio spettro d'azione nell'attività anticonvulsivante.



10

Analogamente al topiramato (**9**), recenti studi clinici hanno dimostrato un potenziale utilizzo terapeutico della zonisamide (**10**) nel dolore neuropatico, nei disturbi bipolari, nell'emicrania, nell'obesità, nelle malattie legate al cibo e nel morbo di Parkinson.

La zonisamide (**10**) è una solfonammide alifatica, che inibisce in maniera potente le anidrasi carboniche citosoliche e mitocondriali coinvolte nella lipogenesi (**Tabella 4**). Inoltre, in associazione con una dieta povera di calorie (deficit di 500 Kcal per giorno), permette di ottenere una riduzione del peso medio di 5 Kg, confrontato con una sola dieta effettuata da pazienti obese di sesso femminile ^[39].

Sia il topiramato (**9**) che la zonisamide (**10**) determinano una perdita di peso dovuta all'inibizione della lipogenesi, mediata da questi due agenti, che a loro volta è mediata dall'inibizione di alcuni isoenzimi CA coinvolti nella carbossilazione del piruvato ad ossaloacetato (isoforme mitocondriali CA VA e VB) e dell'acetil-coenzima-A a malonil-coenzima-A (isoforma citosolica CA II).

L'effetto globale è una potente inibizione della lipogenesi.

Attualmente una combinazione del topiramato (**9**) con la fentermina, Qnexa, è in fase III di sperimentazione clinica per il trattamento dell'obesità, che lo inserisce in una prima classe di farmaci, con un nuovo meccanismo d'azione.

L'inibizione delle isoforme mitocondriali CA VA e CA VB, probabilmente in associazione con l'inibizione delle isoforme citosoliche CA II che sono ubiquitarie, può presentare un passo ulteriore verso la progettazione di nuovi farmaci anti-obesità che riducono la lipogenesi inibendo le anidrasi carboniche ^[36].

Introduzione
Parte Sperimentale

Le anidrase carboniche sono una superfamiglia di metallo-enzimi che catalizzano l'interconversione tra CO_2 e ione bicarbonato. Sono quindi coinvolte in un cruciale processo fisiologico connesso alla respirazione e al trasporto di CO_2 /bicarbonato attraverso i tessuti metabolizzanti ed i polmoni.

Ad oggi sono conosciute cinque distinte famiglie genetiche di diversa evoluzione: α -CA, β -CA, γ -CA, δ -CA, ζ -CA. Nei vertebrati più sviluppati, compresi gli esseri umani, sono stati scoperti quattordici isoenzimi delle α -CA, numerati da I a XIV. Recentemente è stato individuato un ulteriore isoenzima delle α -CA (CA XV), presente in diverse specie animali, eccetto che negli esseri umani e negli scimpanzé. Le diverse famiglie di anidrase carboniche differiscono per lo ione metallico presente nel sito attivo.

Tutte e cinque le classi di enzimi sono zinco-enzimi, ma probabilmente le γ -CAs sono ferro-enzimi, anche se sono comunque attive anche in presenza degli ioni zinco o cobalto^[40,41], mentre le ζ -CAs utilizzano cadmio o zinco per la catalisi delle reazioni fisiologiche^[42,43].

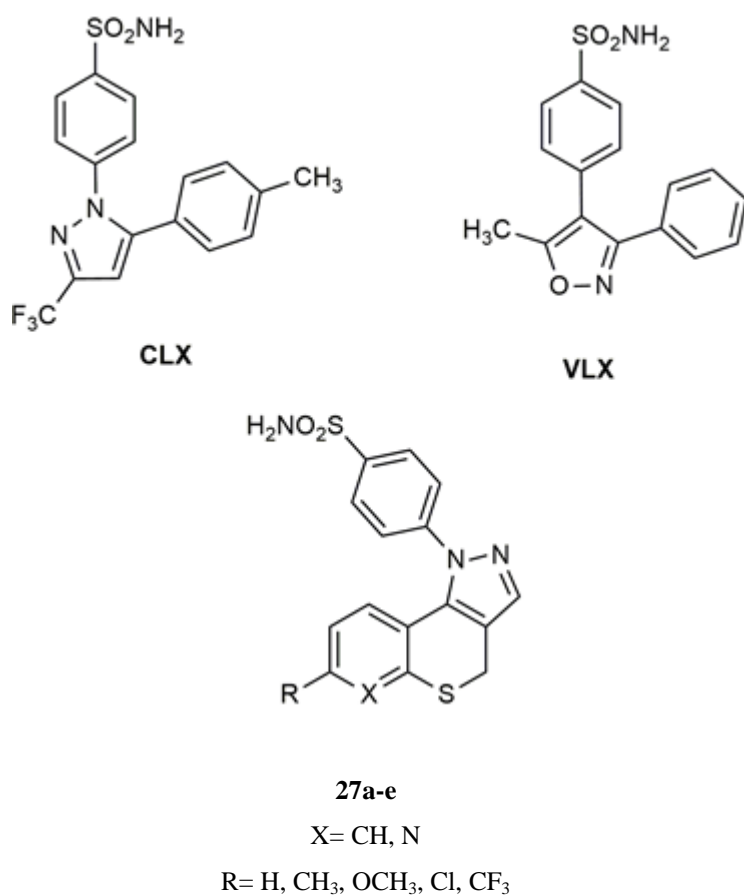
Gli isoenzimi CA svolgono varie importanti funzioni fisiologiche e fisiopatologiche relative alla respirazione e al trasporto di CO_2 /bicarbonato; inoltre regolano il pH e l'omeostasi della CO_2 , la secrezione di elettroliti in una varietà di tessuti e organi, le reazioni di biosintesi (come la gluconeogenesi, la lipogenesi e l'urogenesi), il riassorbimento osseo e la calcificazione. Recentemente è stato evidenziato che sono anche coinvolte in alcuni processi patologici (tumorigenicità, obesità, epilessia, crescita e virulenza di vari patogeni).

Le anidrase carboniche sono enzimi ubiquitari, quindi la loro presenza in così tanti tessuti e in così tante isoforme rappresenta una meta attraente per la progettazione di inibitori con diverse applicazioni biomediche.

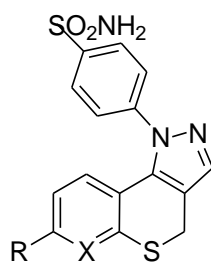
Molti inibitori delle anidrase carboniche (CAI) sono risultati essere agenti efficaci dal punto di vista clinico e negli ultimi anni sono emerse nuove applicazioni dei CAI. Essi possono essere utilizzati quali farmaci antiglaucoma, diuretici, anticonvulsivanti, antiobesità, antipánico ed anche agenti antitumorali o strumenti diagnostici^[44-50]. Di conseguenza sono state sviluppate numerose classi di CAI al fine di modularne le proprietà farmacologiche. Le anidrase carboniche vengono inibite principalmente da due classi di composti: gli anioni complessanti il metallo (tra cui molti carbossilati) e le solfonammidi/sulfamati/sulfammidi, che generalmente si legano allo ione Zn^{2+} del sito

attivo dell'enzima. L'inibizione delle CA non ha solo le applicazioni farmacologiche viste, ma è anche un target emergente nella progettazione di anti-infettivi (agenti antimicotici e antibatterici)^[51-53] con un diverso meccanismo d'azione.

Sulla base di quanto detto, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la mia tesi ha recentemente descritto nuovi derivati triciclici contenenti lo scaffold benzotipiranopirazolico e piridotipiranopirazolico sul quale è stata inserita una funzione benzensolfonammidica **27a-e**^[54]. Questi composti erano stati progettati quali analoghi rigidi di Celecoxib e Valdecoxib, che nati come inibitori specifici delle ciclossigenasi 2 (COX-2), hanno dimostrato di essere anche potenti inibitori delle CAs^[55-57].



I composti **27a-e**, così come i composti di riferimento **CLX** e **VLX** sono stati saggiati quali inibitori catalitici delle isoforme hCA I-XIV (**Tabella 5**) presso il laboratorio del Professor Supuran, C. T. dell'Università di Firenze.



27a-e

27a: X = CH R = OCH₃
27b: X = CH R = Cl
27c: X = CH R = CF₃
27d: X = N R = H
27e: X = N R = CH₃

Tabella 5: Inibizione di hCA isoforme I-XIV con i composti **27a-e**, Celecoxib (CLX) e Valdecoxib (VLX).

Enzyme	K _i (nM) ^α						
	27a	27b	27c	27d	27e	CLX	VLX
hCA I	65	212	318	193	155	50000	54000
hCA II	16	29	210	72	49	21	43
hCA III	22700	32000	28600	6400	7900	7400	78000
hCA IV	8850	7200	7140	328	7500	880	1340
hCA VA	923	440	327	476	992	794	912
hCA VB	1072	3140	3250	3180	3270	93	88
hCA VI	7116	9280	9340	8055	8140	94	572
hCA VII	609	602	628	873	912	2170	3900
hCA IX	2182	1845	2570	2340	3250	16	27
hCA XII	4550	5620	6755	5540	5870	18	13
hCAXIII	938	2810	714	4300	4630	98	425
hCA XIV	931	797	548	715	844	689	107

α: media di tre diversi saggi. Gli errori sono nel range di ± 10 dei valori riportati (dati non mostrati).

La caratteristica principale dei derivati **27a-e** è l'elevata inibizione dell'anidrasa carbonica umana (hCA) I e II, mentre la loro attività inibitoria verso hCA III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII e XIV è risultata di due ordini di grandezza più bassa.

Dall'analisi della **Tabella 5** sono emerse le seguenti relazioni struttura-attività (SAR)^[54]:

- Le isoforme citosoliche hCA I e II sono inibite rispettivamente moderatamente ed efficacemente dai composti **27a-e**. Il profilo di inibizione di questi composti nei confronti di hCA II è risultato simile a quello di Celecoxib e Valdecoxib (**Tabella 5**), mentre nei confronti di hCA I è risultato migliore.

La presenza nello scaffold eterociclico di un benzene o di una piridina porta comunque all'ottenimento di efficaci CAI. Inoltre, nell'ambito dei derivati benzotioipiranicici, gli inibitori più efficaci sono stati quelli recanti il gruppo metossilico (**27a**) o un atomo di cloro (**27b**) in posizione 7, mentre l'introduzione di un gruppo CF₃ (**27c**) ha comportato una minore attività inibitoria nei confronti di entrambe le isoforme.

- L'isoforma citosolica lenta hCA III viene inibita poco sia dai composti **27a-e**, che da celecoxib e valdecoxib. Ciò è probabilmente dovuto ad una specifica struttura del sito attivo dell'enzima hCA III, il quale presenta un ingombrante residuo di Fenilalanina (Phe198) al centro della tasca attiva che interferisce con il legame dei composti **27a-e**, stericamente ingombranti.
- L'isoforma IV di membrana viene inibita moderatamente dai composti **27a-e**. Il composto con un profilo migliore di inibizione rispetto a questa isoforma, è **27d**, che presenta l'anello pirimidinico non sostituito (R = H).
- Le isoforme mitocondriali hCA VA e VB, nonché l'isoforma hCA VI secreta nella saliva, sono inibite da questi composti e dai coxib, con costanti di inibizione nell'intervallo 327-9340 nM.
- Le isoforme citosoliche rimanenti hCA VII e hCA XIII sono inibite moderatamente dai composti **27a-e**. I derivati piridinici **27d-e** hanno mostrato un'attività inibitoria inferiore nei confronti dell'isoforma hCA VII. Sembra che per questa isoforma la natura del sostituito R abbia minor influenza sull'attività inibitoria. Al contrario, per l'inibizione dell'isoforma hCA XIII questo sembra essere il parametro più importante. Infatti il composto **27c** (R = CF₃) mostra i migliori profili di inibizione.

Importante sottolineare che i coxib, VLX e CLX, sono inibitori deboli di hCA VII, ma mostrano un miglior profilo di inibizione nei confronti di hCA XIII.

- Le isoforme transmembrinarie hCA IX, XII e XIV sono inibite moderatamente dai nuovi composti **27a-e**. L'isoforma maggiormente inibita è hCA XIV, mentre l'isoforma meno inibita è hCA XII.

La cristallografia a raggi X e studi di sovrapposizione hanno permesso di spiegare il profilo di inibizione specifico delle pirazolo-solfonammidi, che è risultato piuttosto differente da quello dei composti di riferimento CLX e VLX. In particolare, per analizzare il tipo di inibizione ottenuta con questi derivati sono stati condotti studi di cristallografia a raggi X del composto **27e** complessato con l'enzima hCA II (**Figura 13**).

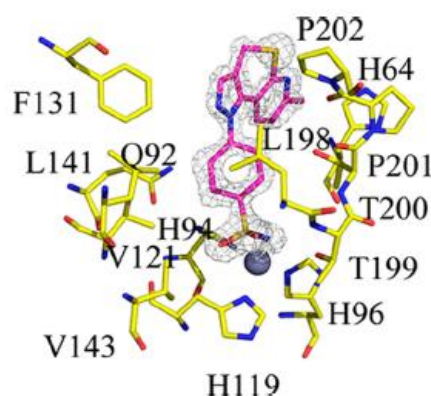


Figura 13. Rappresentazione del sito attivo dell'enzima hCA II complessato con il composto **27e** (rosa). Lo ione zinco nel sito attivo è rappresentato come una sfera grigia.

Da questo studio è risultato che il composto **27e** si inserisce profondamente nel sito attivo dell'enzima, spiazzando il solvente legato allo zinco catalitico, per cui l'azoto della solfonammide si lega direttamente allo ione zinco. L'azoto e l'ossigeno della solfonammide si trovano infatti ad una giusta distanza per formare legami a idrogeno con la Treonina 199 (**Figura 13**).

L'atomo di zolfo distorce l'anello tiopiranoico, ma non è direttamente coinvolto nell'interazione con l'enzima hCA II. Gli anelli idrofobici del sistema eterociclico si protendono all'esterno e sono stabilizzati principalmente da residui idrofobici che delimitano la cavità del sito attivo, coinvolgendo interazioni di Van der Waals con le catene laterali di Valina 121, Fenilalanina 131, Leucina 198, Prolina 202 ed Istidina 64.

In **Figura 14** è riportata la sovrapposizione della struttura hCA II-**27e** (**Figura 14A**) che è stata effettuata parallelamente con quella di VLX (**Figura 14B**) e CLX (**Figura 14C**).

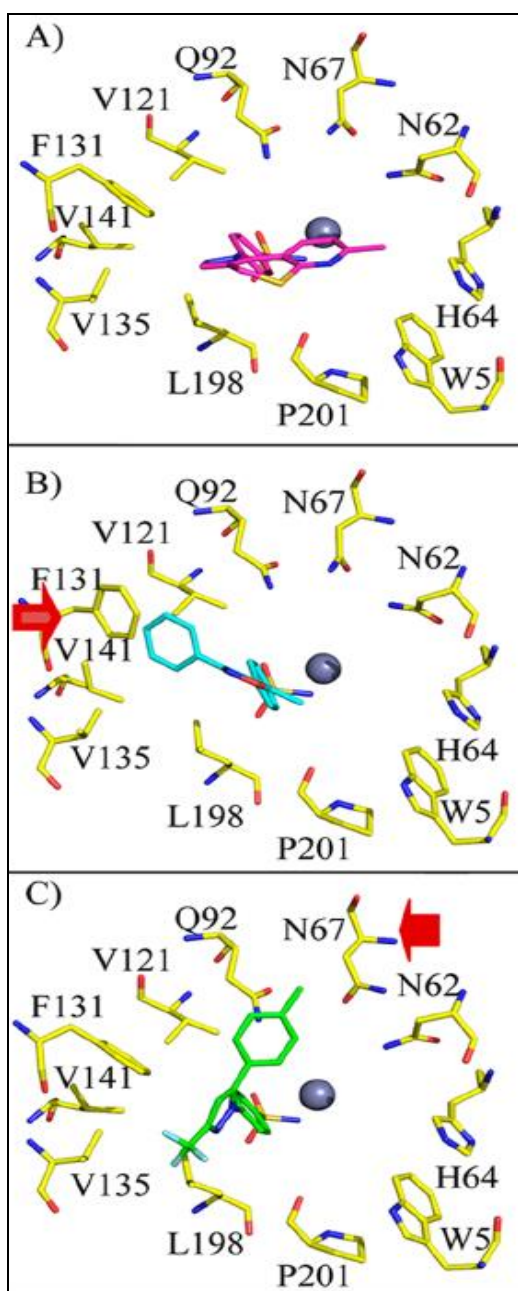


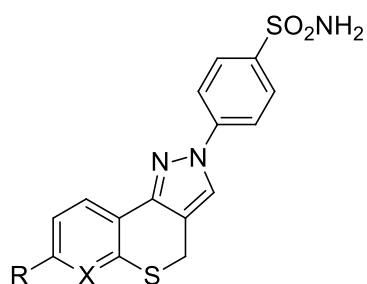
Figura 14. Rappresentazione dei composti **27e** (A, rosa), di VLX (B, ciano) e di CLX (C, verde) sovrapposti sul sito attivo della hCA II. Gli amminoacidi sono rappresentati come bastoncini gialli, mentre lo ione zinco nel sito attivo è rappresentato come una sfera grigia. Le frecce rosse indicano il cambiamento conformazionale di hCA II nel legame con l'inibitore.

L'aspetto più interessante di questa comparazione ha rivelato che tutti e tre i composti si legano allo ione zinco del sito attivo e che i loro gruppi terminali hanno la capacità di occupare zone diverse sulla superficie del sito attivo. In particolare, l'anello fenilico idrofobico di VLX spinge fuori la Fenilalanina 131 dalla tasca idrofobica a differenza dei composti **27e** (**Figura 14a**) e CLX (**Figura 14B**). L'anello fenilico idrofobico di CLX costringe l'Asparagina 67 a cambiare conformazione (**Figura 14C**), inoltre CLX ha sia una regione idrofila ricca di fluoro che un anello fenilico idrofobico, ciò gli conferisce un orientamento insolito. Per quanto riguarda il composto **27e**, l'atomo di azoto idrofilo fuso nell'anello piridinico, può essere coinvolto nel legame a idrogeno con il solvente e quindi non necessita della presenza nella tasca idrofobica della Fenilalanina 131 (**Figura 14A**).

Nonostante i cambiamenti conformazionali delle catene laterali dei tre inibitori (**27e**, VLX e CLX) che interagiscono con hCA II e i loro diversi orientamenti all'interno del sito attivo, tutti e tre interagiscono con circa le stesse dimensioni superficiali della proteina, che è rispettivamente: 407, 451 e 409 Å² [54].

I risultati ottenuti hanno indicato che le benzensolfonammidi **27a-e** costituiscono una nuova classe di inibitori delle anidrasi carboniche altamente interessante, in quanto presentano specificità nei confronti di un numero ristretto di isoforme CA.

Lo sviluppo di questo studio allo spostamento della porzione benzen-solfonammidica dalla posizione 1 alla posizione 2 del nucleo pirazolico (composti di formula generale **28**).



28a-e

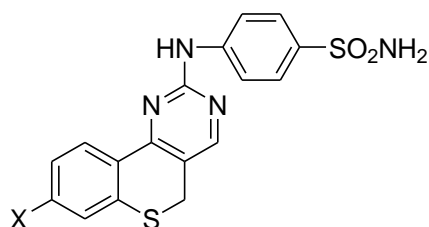
- | | | |
|-------------|--------|----------------------|
| 28a: | X = CH | R = OCH ₃ |
| 28b: | X = CH | R = Cl |
| 28c: | X = CH | R = CF ₃ |
| 28d: | X = N | R = H |
| 28e: | X = N | R = CH ₃ |

La sintesi dei derivati **28a-d** è già stata effettuata in una precedente tesi ed i composti ottenuti sono stati inviati a screening farmacologico presso il laboratorio del Professor Supuran.

È stata inoltre possibile una modifica dello scaffold, progettando la sintesi degli omologhi superiori contenenti il nucleo pirimidinico.

Questo ha permesso di introdurre la porzione benzen-solfonammidica in posizione 2 dell'anello pirimidinico.

Lo scopo della mia tesi è stato quello di sintetizzare solfonammidi benzotipirano-pirimidiniche **29, 30, 31**.

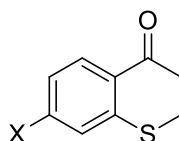


29 X= H

30 X= Cl

31 X= OCH₃

I nuovi derivati **29-31** sono stati sintetizzati a partire dai corrispondenti benzotipiranoici **32-34**.



32 X= H

33 X= Cl

34 X= OCH₃

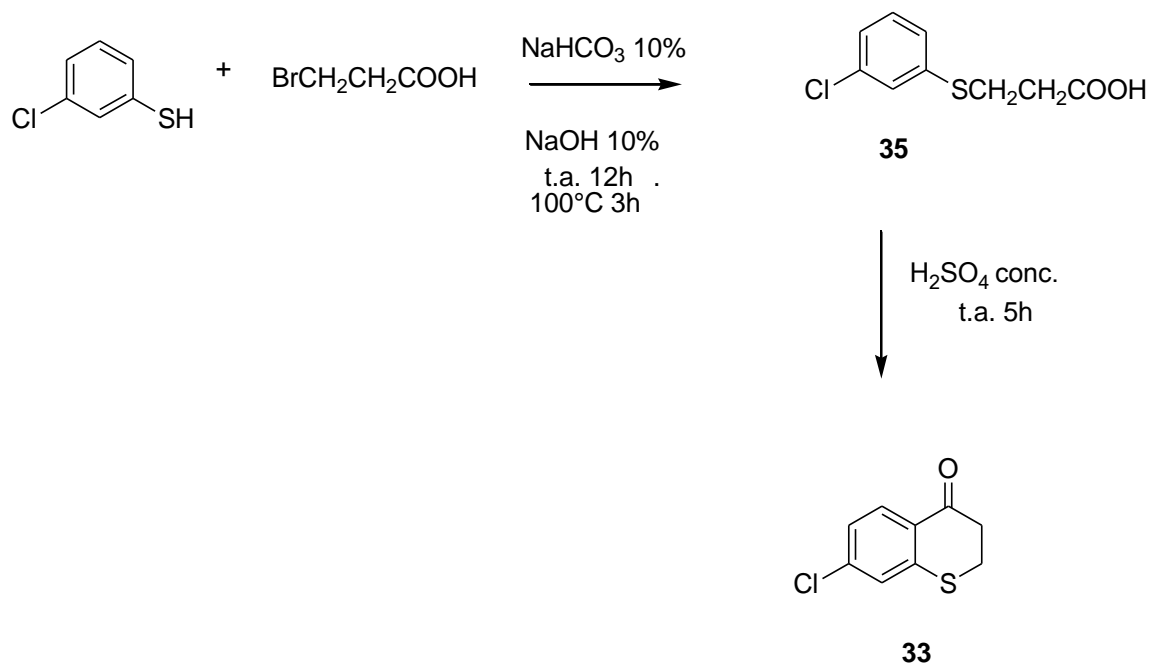
In particolare per la sintesi del derivato non sostituito in posizione 7 (**29**) è stato utilizzato, quale prodotto di partenza, il benzotipirano **32**, commercialmente disponibile.

La sintesi impiegata nella preparazione del composto **30** ha coinvolto, come primo step, la preparazione del derivato 7-cloro-2,3-diidro-1-benzotiopiran-4(4*H*)-one **33**, già descritto in letteratura ^[59](**Schema di sintesi 1**).

Una soluzione di acido 3-bromopropionico in NaHCO₃ al 10% è addizionata ad una soluzione di 3-clorotiofenolo in NaOH al 10%.

La miscela di reazione è sottoposta ad agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente a riflusso per 3 ore. La soluzione ottenuta, dopo raffreddamento, è acidificata con acido cloridrico concentrato fino a pH 4. Il solido bianco, precipitato è raccolto mediante filtrazione per ottenere il corrispondente acido tiopropionico puro **35**, che per trattamento con acido solforico concentrato, a temperatura ambiente per 5 ore, è ciclizzato a dare il 2,3-diidro-1-benzotiopiran-4(4*H*)one **33**, purificato tramite cristallizzazione da etere di petrolio 40-60 °C (**Schema di sintesi 1**).

Schema di sintesi 1.

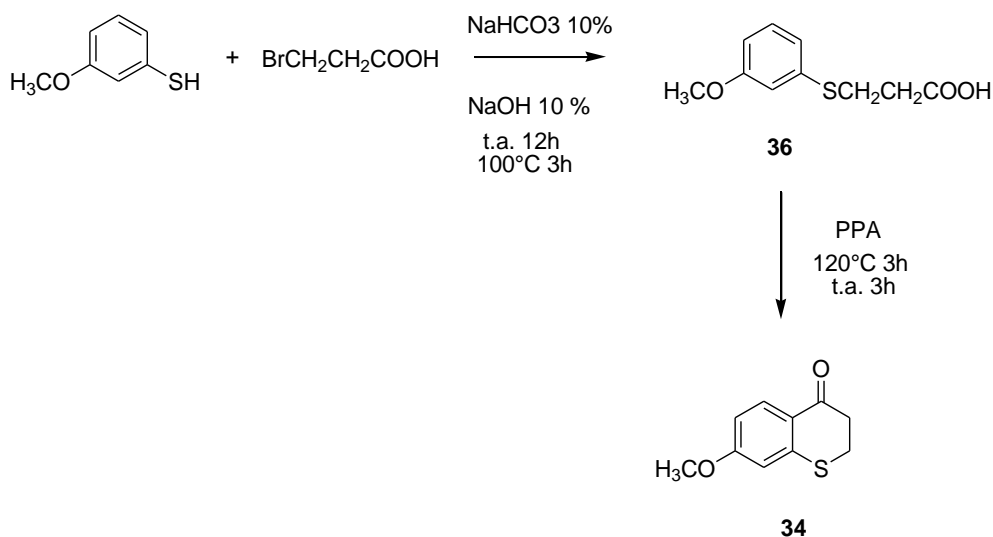


Infine, la sintesi impiegata nella preparazione del composto **31** ha coinvolto, come primo passaggio, la preparazione del derivato 7-metossi-2,3-diidro-1-benzotiopiran-4(4*H*)-one **34**, **Schema di sintesi 2**.

Una soluzione di acido 3-bromopropionico NaHCO_3 al 10% è stata aggiunta ad una soluzione di 3-metossitiofenolo in NaOH al 10%.

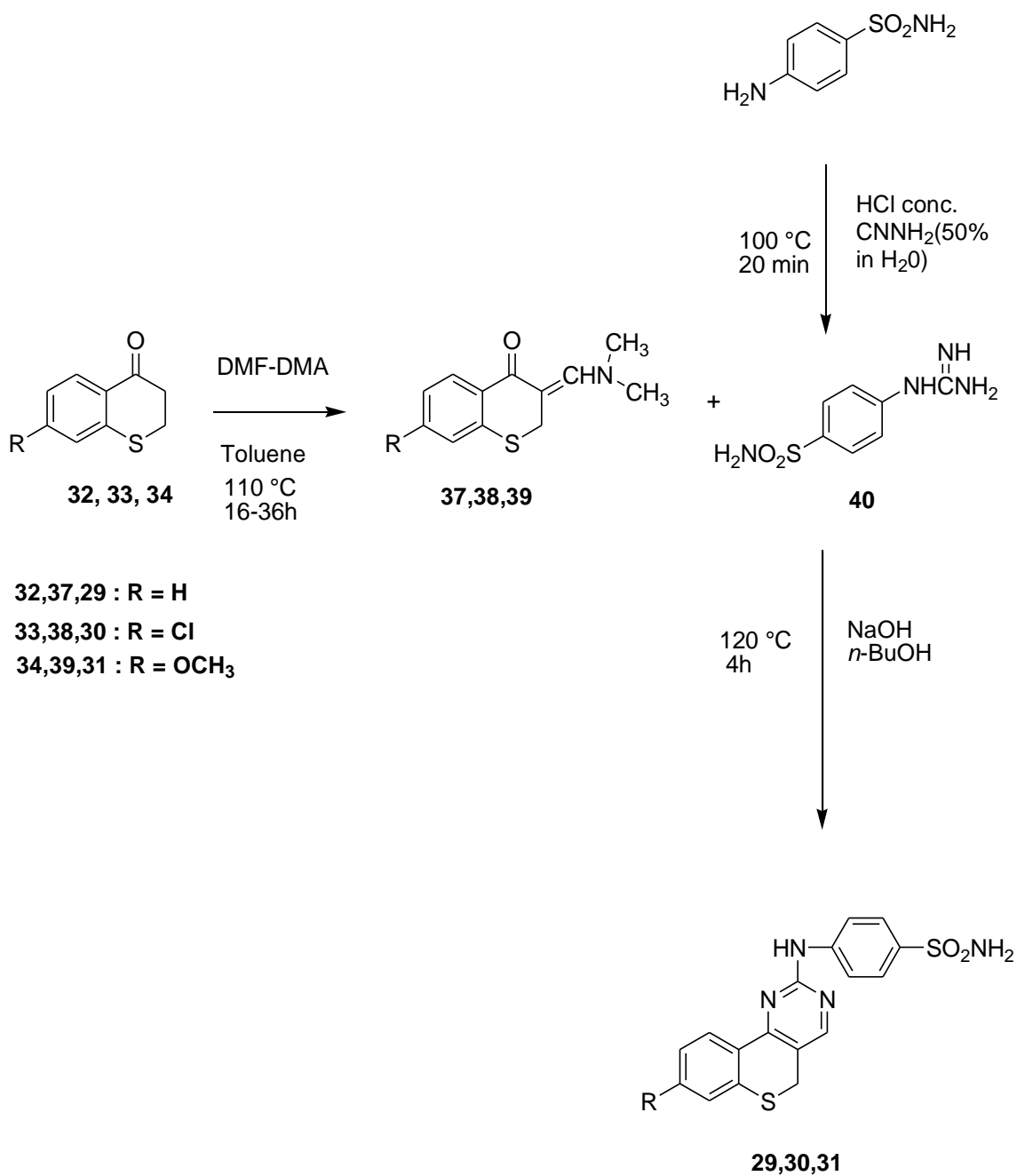
La miscela di reazione è stata sottoposta ad agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente a riflusso per 3 ore. La soluzione ottenuta, dopo raffreddamento, è acidificata con acido cloridrico concentrato fino a pH 4. Il solido precipitato è stato raccolto mediante filtrazione per ottenere il corrispondente acido tiopropionico puro **36**. Il composto ottenuto viene addizionato di acido polifosforico (PPA). La miscela di reazione viene riscaldata sotto continua agitazione magnetica a 120°C per 3 ore e mantenuta a temperatura ambiente per 3 ore. Dopo raffreddamento, la sospensione ottenuta è versata in ghiaccio. La soluzione ottenuta viene estratta con CHCl_3 e la fase organica è seccata su MgSO_4 , filtrata ed evaporata a pressione ridotta, ottenendo il derivato 2,3-diidro-1-benzotiopiran-4(4*H*)one **34** che viene infine purificato tramite cromatografia flash utilizzando come miscela eluente: Esano/ AcOEt 9:1 (**Schema di sintesi 2**).

Schema di sintesi 2.



Il thiocroman-4-one **32**, il 7-cloro-2,3-diidro-1-benzotiofiran-4(4H)-one **33** ed il 7-metossi-2,3-diidro-1-benzotiofiran-4(4H)-one **34** hanno rappresentato gli intermedi chiave per la preparazione dei nuovi derivati benzotiofiran-pirimidinici **29, 30, 31** (Schema di sintesi 3).

Schema di sintesi 3.



La sintesi dei derivati **29**, **30** e **31** ha coinvolto come primo passaggio, la preparazione degli intermedi **37**, **38** e **39**. Ad una soluzione dei chetoni **32,33** e **34** in toluene viene aggiunta dimetilformammide dimetilacetale (DMF-DMA). La soluzione risultante è scaldata a riflusso per 16-36 ore. Dopo raffreddamento viene eliminato il solvente a pressione ridotta e il residuo ottenuto viene triturato con Et₂O e filtrato.

I composti **37**, **38** e **39** sono stati ottenuti sufficientemente puri per essere utilizzati nella reazione successiva con la solfonammide **40**, senza ulteriori purificazioni.

Il derivato **40** è stato ottenuto per reazione tra una soluzione al 50% in acqua di cianammide e una soluzione di sulfanilammide in HCl concentrato. La miscela è scaldata a 100°C per 20 minuti. Dopo raffreddamento la soluzione ottenuta viene trasferita in un becker contenente una soluzione satura di NaHCO₃ a 0°C e lasciata nel freezer per una notte. Il precipitato corrispondente alla guanidina bicarbonato **40** è stato ottenuto per filtrazione.

Infine i prodotti finali **29**, **30** e **31** sono stati ottenuti aggiungendo ad una soluzione dei derivati **37**, **38** e **39** in *n*-BuOH il derivato guanidinico **40** in ambiente alcalino per NaOH. La soluzione viene scaldata a 120°C per 4 ore. Dopo raffreddamento si forma un precipitato che viene filtrato. I prodotti ottenuti sono purificati mediante cromatografia flash su colonna di gel di silice utilizzando come miscela eluente : Esano/ AcOEt 5:5.

I nuovi composti ottenuti **29**, **30** e **31** sono stati caratterizzati mediante dati analitici e spettroscopici ed i dati risultanti sono in accordo con le strutture proposte. Questi derivati benzotipiranopirimidinici sono stati avviati a screening farmacologico presso il laboratorio del Prof. Supuran ma i relativi risultati non sono al momento disponibili.

Parte Sperimentale

MATERIALI E METODI

Se non diversamente specificato, tutti i solventi ed i reagenti utilizzati per la sintesi sono stati acquistati dalle ditte fornitrici e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione.

Come agente essiccante è stato utilizzato il solfato di magnesio.

L'evaporazione dei solventi è stata effettuata sottovuoto utilizzando l'evaporatore ruotante.

Le rese (%) si riferiscono a composti cromatograficamente e spettroscopicamente (^1H -NMR) omogenei.

Le reazioni sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile (T.L.C.) realizzate su foglio di alluminio ricoperto di silice (MERK 60 F-254, spessore 0.2 mm).

Per le colonne cromatografiche è stato utilizzato il gel di silice 60 (230-400 mesh).

Gli spettri di risonanza magnetica del protone (^1H -NMR) sono stati eseguiti in soluzione di cloroformio deuterato ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$), oppure in una soluzione di dimetilsolfossido esa-deuterato (DMSO-d_6) con uno spettrometro Brucker-400 (400-MHz) utilizzando $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ (TMS) come standard interno.

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio di Reichert Köfler e non sono stati corretti.

I composti **33**, **34**, **35**, **36**, **37**, **38**, **39** e **40** sono stati già descritti in lavori precedenti ^[58-62].

Acido 3-[(3-clorofenil)tio]propionico **35** ^[58]

Ad una soluzione di 3-clorotiofenolo (3.3 ml, 28.5 mmoli) in 12 ml di NaOH 10% si aggiunge una soluzione di acido 3-bromopropionico (4.580 g, 36.5 mmoli) in 28 ml di NaHCO₃ al 10%. La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente a riflusso per 3 ore. La miscela di reazione viene acidificata con HCl conc. fino a pH 4. Si forma un solido bianco che viene raccolto per filtrazione.

*Acido 3-[(3-clorofenil)tio]propionico **35***. Resa 92%; P.f.: 72-74 °C; (lit. ref. n° 58; P.f.: 77-78 °C).

7-cloro-2,3-diidro-1-benzotiopiran-4(4*H*)-one **33** ^[58]

A 5.66 g (26.2 mmoli) dell'acido 3-[(3-clorofenil)tio]propionico **35** vengono addizionati 45 ml di acido solforico conc. La miscela di reazione viene tenuta in agitazione magnetica a temperatura ambiente per circa 5 ore, controllandone l'andamento mediante T.L.C. miscela eluente: etere di petrolio 40-60 °C / AcOEt 8:2. Successivamente la miscela di reazione è versata in ghiaccio e il solido che precipita viene raccolto per filtrazione. Il composto desiderato **33** viene purificato mediante cristallizzazione da etere di petrolio 40-60 °C.

*7-Cloro-2,3-diidro-1-benzotiopiran-4(4*H*)-one **33***. Resa 71%; P.f.: 62-64°C; (lit. ref. n° 58; P.f.: 64-65.5 °C).

Acido 3-[(3-metossifenil)tio]propionico **36** ^[58]

1.76 ml (14,0 mmoli) di 3-metossitiofenolo vengono solubilizzati in 12 ml di una soluzione di NaOH 10%. 2.716 g (18,0 mmoli) di acido 3-bromopropionico vengono solubilizzati in una soluzione di 1.508 g (18 mmoli) di NaHCO₃ in 14 ml di H₂O. Le due soluzioni vengono riunite e la miscela così ottenuta è lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12 ore e quindi a riflusso per 3 ore. Si ottiene una soluzione che viene acidificata a 0°C con HCl conc. fino a pH=4. Il solido bianco che precipita viene raccolto per filtrazione ottenendo 2.437 g di prodotto **36**.

*Acido 3-[(3-metossifenil)tio]propionico **36*** Resa 82 %. P.f. 56-58°C; (lit.ref. n°58; P.f : 58-60°C.

7-metossi-2,3-diidro-4H-1-benzotiopiran-4-one **34** ^[58]

2.00 g (1,0 mmoli) del composto **36** vengono addizionati con 20.0 g di acido polifosforico (PPA). La miscela di reazione viene riscaldata sotto continua agitazione magnetica a 120°C per 3 ore e mantenuta a temperatura ambiente per 3 ore. Dopo raffreddamento, la sospensione ottenuta è versata in ghiaccio e acqua e la soluzione viene estratta con CHCl₃. La fase organica è seccata su MgSO₄, filtrata ed evaporata a pressione ridotta, ottenendo un residuo che viene purificato per cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come miscela eluente: Esano/AcOEt 9:1.

*7-Metossi-2,3-diidro-4H-1-benzotiopiran-4-one **34*** Resa 40 %. P.f. 54-55°C (lit.ref. n°58; P.f : 55-56 °C

3-dimetilamminometilen-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one 37 ^[59]

3-dimetilamminometilen-7-cloro-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one 38 ^[60]

3-dimetilamminometilen-7-metossi-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one 39 ^[61]

2.28 mL (17,0 mmoli) di dimetilformammide dimetilacetale (DMF-DMA) vengono addizionati ad una soluzione dei derivati benzotioipiranoici **37**, **38** o **39** (7.0 mmol) in 10 mL di toluene. La miscela risultante viene fatta rifluire per 16-36 ore controllando l'andamento della reazione mediante T.L.C: AcOEt/Esano (in diversi rapporti). Dopo raffreddamento si ottiene una soluzione che viene portata a secco a pressione ridotta. Il residuo oleoso ottenuto viene grattato con Et₂O in bagno di ghiaccio. Si forma un precipitato che viene filtrato, ottenendo i prodotti desiderati **37**, **38** o **39**.

3-dimetilamminometilen-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one 37 Resa 79% ; P.f. : 110-112 °C ;(lit.ref.n° 59; P.f. :112-113 °C)

3-dimetilamminometilen-7-cloro-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one 38 Resa 90%; P.f. : 103-106 °C; (lit.ref.n° 60; P.f. : 105-110°C °C)

3-dimetilamminometilen-7-metossi-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one 39 Resa 92% ; P.f. : 113-115°C; (lit. ref. n° 61; P.f.: 115-120 °C).

N-(4-amminosulfonilfenil)guanidina carbonato 40^[62]

Ad una soluzione di 0.260 g di sulfanilammide (1.5 mmol) in HCl conc. (0.4 mL) viene aggiunta (0.6 mL e 14,27 mmol) di cianammide (soluzione al 50% p:p). La miscela è scaldata a 100°C per 20 minuti.

Dopo raffreddamento la miscela viene trasferita in un becker contenente soluzione satura di NaHCO₃ a 0°C e tenuto nel freezer tutta la notte. Si forma un precipitato che viene raccolto per filtrazione.

N-(4-amminosulfonilfenil)guanidina carbonato **40** Resa 70% ^[62].

5H- tiocromano[4,3-d]pirimidin-2-benzensolfonammide 29

8-cloro- 5H- tiocromano[4,3-d]pirimidin-2-benzensolfonammide 30

8-metossi- 5H- tiocromano[4,3-d]pirimidin-2-benzensolfonammide 31

N-(4-amminosulfonilfenil)guanidina carbonato **40** (0.332 g, 1.2 mmol) e NaOH (0.096 g, 2,4 mmol) sono aggiunti ad una soluzione dell'appropriato 3-dimetilamminometilentiopirano **37**, **38** o **39** (1.2 mmol) in 10 mL di *n*-BuOH. La soluzione viene scaldata a 120°C per 4 ore.

Dopo raffreddamento il precipitato ottenuto viene raccolto per filtrazione. Tutti i prodotti finali vengono purificati mediante cromatografia flash miscela eluente: AcOEt / Esano= 5:5

5H- tiocromano[4,3-d]pirimidin-2-benzensolfonammide 29. Resa: 44% P.f.: 275-278 °C
¹H-NMR (DMSO-d₆, ppm): 4.06 (s, 2H, CH₂); 7.20 (bs, 2H, NH₂ scambio con D₂O); 7.41-7.46 (m, 3H, Ar H); 7.76-7.78 (m, 2H, Ar H); 7.97-7.99 (m, 2H, Ar H); 8.32-8.34 (m, 1H, Ar H); 8.56 (s, 1H, Ar H); 10.15 (bs, 1H, NH, scambio con D₂O).

8-cloro-5H- tiocromano[4,3-d]pirimidin-2-benzensolfonammide **30**. Resa: 45%. P.f.: 268-270 °C ¹H-NMR (DMSO-d₆, ppm): 4.10 (s, 2H, CH₂); 7.21 (bs, 2H, NH₂ scambio con D₂O); 7.47-7.50 (m, 1H, Ar H); 7.59-7.60 (m, 1H, Ar H); 7.77 (d, 2H, Ar H, *J*=8.8 Hz); 7.97 (d, 2H, Ar H, *J*=8.8 Hz); 8.30 (d, 1H, Ar H, *J*=8.8 Hz); 8.56 (s, 1H, Ar H); 10.18 (bs, 1H, NH, scambio con D₂O).

8-metossi-5H- tiocromano[4,3-d]pirimidin-2-benzensolfonammide **31**. Resa: 31 %. P.f.: 228-230 °C ¹H-NMR (DMSO-d₆, ppm)): 3.84 (s, 3H, -OCH₃); 4.05 (s, 2H, CH₂); 6.98-7.01 (m, 2H, Ar H); 7.19 (bs, 2H, NH₂ scambio con D₂O); 7.76 (d, 2H, Ar H, *J*=8.8 Hz); 7.97 (d, 2H, Ar H, *J*=9.2 Hz); 8.27 (d, 1H, Ar H, *J*=8.8 Hz); 8.48 (s, 1H, Ar H); 10.07 (bs, 1H, NH, scambio con D₂O).

Bibliografia

- [1] Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.* , **2003** , 23, 146-189.
- [2] Hilvo, M.; Tolvanen, M.; Clark, A.; Shen, B.; Shah, G. N.; Waheed, A.; Halmi, P.; Hanninen, M.; Hamalainen, J. M.; Vihinen, M.; Sly, W. S.; Parkkila, S. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, **2005** , 392 , 83-92.
- [3] Guerri, A.; Briganti, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Mangani, S. Mechanism of cyanamide hydration catalyzed by carbonic anhydrase II suggested by cryogenic X-ray diffraction. *Biochemistry* , **2000** , 39, 12391-12397.
- [4] Whittington, D. A.; Grubb, J. H.; Waheed, A.; Shah, G. N.; Sly, W. S.; Christianson, D. W. Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J. Biol. Chem.* , **2004** , 279, 7223-7228.
- [5] Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases as Drug Targets, An Overview Current Topics in *Medicinal Chemistry* , **2007** , 7, 825-833.
- [6] Supuran C. T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Disc.* , **2008** , 7, 168-181.
- [7] Khalifah, R. J. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J. Biol. Chem.* , **1971** , 246, 2561-2573.
- [8] (a) Clare, B. W.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators. Part 3. Structure-activity correlations for a series of isozyme II activators. *J. Pharm. Sci.* **1994** , 83, 768-773; (b) Temperini, C.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran C.T., Carbonic anhydrase activators. Activation of isoforms I, II, IV, VA, VII, and XIV with L- and D-phenylalanine and crystallographic analysis of their adducts with isozyme II:

stereospecific recognition within the active site of an enzyme and its consequences for the drug design. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 3019-3027.

[9] (a) Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Vernaglione, G.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine. *Biochemistry*, **1997**, 36, 10384-10392; (b) Temperini, C.; Scozzafava, A.; Puccetti, L.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: X-ray crystal structure of the adduct of human isozyme II with L-histidine as a platform for the design of stronger activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 5136-5141; (c) Temperini, C.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators. Activation of isozymes I, II, IV, VA, VII, and XIV with l- and d-histidine and crystallographic analysis of their adducts with isoform II: engineering proton-transfer processes within the active site of an enzyme. *Chemistry*, **2006**, 12, 7057-7066; (d) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran C.T., Carbonic anhydrase activators: L-Adrenaline plugs the active site entrance of isozyme II, activating better isoforms I, IV, VA, VII, and XIV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 628-635; (e) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: kinetic and X-ray crystallographic study for the interaction of D- and L-tryptophan with the mammalian isoforms I-XIV. *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16, 8373-8378.

[10] Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Vernaglione, G.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with istamine. *Biochemistry*, **1997**, 36, 10384-10392.

[11] Stams, T.; Christianson, D. W. X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. *In The Carbonic Anhydrases—New Horizons*; Chegwiddden, W. R., Edwards, Y., Carter, N., Eds.; Birkhäuser Verlag, Basel, **2000**; 159–174.

[12] Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., Eds.; *Carbonic Anhydrase*. Its

Inhibitors and Activators; CRC Press: Boca Raton (FL), USA, **2004** ; 1–363.

[13] (a) Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases as Drug Targets—General Presentation. In *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications* ; Supuran, C. T., Winum, J. Y., Eds.; Wiley: Hoboken (NJ), **2009** ; 15–38; (b) Winum, J. Y.; Rami, M.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran C., Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents. *Med. Res. Rev.* , **2008** , 28, 445-463; (c) Domsic, J. F.; Avvaru, B. S.; Kim, C. U.; Gruner, S. M.; Agbandje-McKenna, M.; Silverman, D. N.; McKenna, R., Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *J. Biol. Chem.* , **2008** , 283, 30766-30771.

[14] (a) Supuran C. T., Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr. Pharm. Des.* . **2008** , 14, 641-648; (b) Supuran, C. T.; Di Fiore, A.; De Simone G., Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2008** , 13, 383-392; (c) De Simone, G.; Di Fiore, A.; Supuran C. T., Are carbonic anydrase inhibitors suitable for obtaining antiobesity drugs?. *Curr. Pharm. Des.* . **2008** , 14, 655–660; (d) Mincione, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Antiglaucoma Carbonic Anhydrase Inhibitors as Ophthalmologic Drugs. In *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*; Supuran, C. T., Winum, J. Y., Eds.; Wiley: Hoboken (NJ), **2009** ; 139–154; (e) Krungkrai, J.; Supuran C. T., The alpha-carbonic anhydrase from the malaria parasite and its inhibition. **Curr. Pharm. Des.** , **2008** , 14, 631-640.

[15] Mincione, F. et al . The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. *Curr. Top. Med. Chem.* , **2007** , 7, 849–854.

[16] Sugrue, M. F. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog. Retin. Eye Res.* , 2000 , 19, 87–112.
effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring? *J. Med.*

Chem., **1999**, 42, 2641–2650.

[17] Scozzafava, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 74. Synthesis of water-soluble, topically effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring? *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2641-2650.

[18] Temperini, C.; Innocenti, A.; Mastrolorenzo, A.; Scozzafava, A.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase inhibitors. Interaction of the antiepileptic drug sulthiame with twelve mammalian isoforms: kinetic and X-ray crystallographic studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 4866-4872.

[19] Steele, R. M.; Batugo, [21] Scozzafava, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 74. Synthesis of water-soluble, topically M. R.; Benedini, F.; Biondi, S.; Borghi, V.; Carzaniga, L.; Impagnietello, F.; Miglietta, D.; Chong, W. K. M.; Rajapakse, R.; Cecchi, A.; Temperini, C.; Supuran C. T., Nitric oxide-donating carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of open-angle glaucoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6565-6570.

[20] Fabrizio Carta Sameh M. Osman , Daniela Vullo , Antonella Gullotto , Jean-Yves Winum ,Zeid AlOthman , Emanuela Masini, and Claudiu T. Supuran Poly(amidoamine) Dendrimers with Carbonic Anhydrase Inhibitory Activity and Antiglaucoma Action *J. Med. Chem.*, **2015**, 58 (9), pp 4039–4045

[21] Gao, B. B. et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nature Med.*, **2007**, 13, 181–188.

[22] Maren, T. H. The development of topical carbonic anhydrase inhibitors. *J. Glaucoma*, **1995**, 4, 49–62.

[23] Innocenti, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the membrane-

bound human and bovine isozymes IV with sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , **2005** , 15, 1149–1154.

[24] Liao, S. Y. et al. Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CA XII) in glaucoma. *J. Med. Genet.*, **2003** , 40, 257–261.

[25] Thiry, A.; Supuran, C. T.; Masereel, B.; Dogné, J. M., Recent developments of carbonic anhydrase inhibitors as potential anticancer drugs. *J. Med. Chem.* , **2008** , 51, 3051-3056.

[26] Brahimi-Horn, M. C. & Pouyssegur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.*, **2007** , 581, 3582–3591.

[27] Thiry, A. et al . Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* , **2006** , 27, 566–573.

[28] Nishimori, I. et al . Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J. Med. Chem.* , **2007** , 50, 381–388.

[29] Vullo, D., et al . Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003** , 13, 1005–1009.

[30] Teicher, B. A.; Liu, S. D.; Liu, J. T.; Holden, S. A.; Herman, T. S. A carbonic anhydrase inhibitor as a potential modulator of cancer therapies. *Anticancer Res.* , **1993** , 13, 1549–1556.

[31] Abbate, F. et al . Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , **2004** , 14, 217–223.

- [32] Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocenti, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A., A novel class of carbonic anhydrase inhibitors: glycoconjugate benzene sulfonamides prepared by “clicktailing”. *J. Med. Chem.* **2006** , 49, 6539–6548.
- [33] De Simone, G.; Vitale, R. M.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX. *J. Med. Chem.* **2006** , 49, 5544–5551.
- [34] Köhler, K. et al. Saccharin inhibits carbonic anhydrases: possible explanation for its unpleasant metallic aftertaste. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2007** , 46, 7697–7699.
- [35]. Ahlskog, J. K.; Schliemann, C.; Mårilind, J.; Qureshi, U.; Ammar, A.; Pedley, R. B.; Neri, D. Br., Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours. *J. Cancer* , **2009** , 101, 645-657.
- [36] Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2003** , 13, 1545–1550.
- [37] Casini, A.; Antel, J.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; David, S.; Waldeck, H.; Schäfer, S.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II and IV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003** , 13, 841-845.
- [38] Picard, F. et al. Topiramate reduces energy and fat gains in lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats. *Obesity Res.*, **2000** , 8, 656–663.
- [39] Gadde, K. M. et al . Zonisamide for weight loss in obese adults: a randomized controlled trial. *JAMA* , **2003** , 289, 1820–1825.
- [40] Smith, K. S.; Jakubzick, C.; Whittam, T. S.; Ferry, J. G. Carbonic anhydrase is an

ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999** , 96, 15184-15189.

[41] Zimmerman, S. A.; Ferry, J. G.; Supuran, C. T. Inhibition of the Archaeal β -Class (Cab) and γ -Class (Cam) Carbonic Anhydrases. *Curr. Top. Chem.* **2007** , 7, 901-908.

[42] Tructure and metal Exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* **2008** , 452, 56-61.

[43] Alterio, V.; Langella, E.; Viparelli, F.; Vullo, D.; Ascione, G.; Dathan, N. A.; Morel, F. M. M.; Supuran, C. T.; De Simone, G.; Monti, S. M. structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CdCA 1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Biochimie* **2012** , 94, 1232-1241.

[44] Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Multiple Binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 differnt isoforms. *Chem. Rev.* **2012** , 112, 4421-4468.

[45] Supuran, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Rev. Drug Discovery* **2008** , 7, 168-181.

[46] Ahlskog, J. K.; Schliemann, C.; Marlind, J.; Qureshi, U.; Ammar, A.; Pedley, R. B.; Neri, D. In vivo targeting of tumor-associated carbonic anhidrases using acetazolamide derivates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009** , 19, 4851-4856.

[47] Neri, D.; Supuran, C. T. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Rev. Drug Discovery* **2011** , 10, 767-777.

[48] Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010** , 20, 3467-3474.

- [49] Pastorekova, S; Parkkila, S; Pastorek, J; Supuran, C. T. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004** , 19, 199–229.
- [50] Supuran, C. T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012** .
- [51] Cottier, F.; Raymond, M.; Kurzai, O.; bolsa, M.; Leewattanapasuk, W.; Jimenez-Lopez, C.; Lorenz, M. C.; Sanglard, D.; Vachova, L.; Pavelka, N.; Palkova, Z.; Muhlschlegel, F. A. The bZIP transcription factor Rcalp is a central regulator of a novel CO₂ sensing pathway in yeast. *PLOS Pathogens* **2012** , 8, e10002485.
- [52] Mogensen, E. G.; Janbon, G.; Chaloupka, J.; Steegborn, C.; Fu, M. S.; Moyrand, F.; Klengel, T.; Pearson, D. S.; Geeves, M. A.; Buck, J.; Levin, L. R.; Muhlschlegel, F. A. Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing cAMP signaling and virulence. *Curr . Biol .* **2005** , 15, 2021-2026.
- [53] Supuran, C. T. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: towards novel antibiotics? *Front. Pharmacol.* **2011** , 2, 34.
- [54] Marini, A. M.; Maresca, A.; Aggarwal, M.; Orlandini, E.; Nencetti, S.; Da Settimo, F.; Salerno, S.; Simorini, F.; La Motta, C.; Taliani, S.; Nuti, E.; Scozzafava, A.; McKenna, R.; Rossello, A.; Supuran C.T., Tricyclic Sulfonamides Incorporate Benzothiopyrano[4,3-c]pyrazole and Pyridothiopyrano[4,3-c]pyrazole Effectively Inhibit α - and β -Carbonic Anhydrase: X-ray Crystallography and Solution Investigations on 15 Isoforms. *J. Med. Chem.* **2012** , 55, 9619-9629.
- [55] Weber, A.; Casini, A.; Heine, A.; Kuhn, D.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Klebe, G. Unexpected nano molar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2 selective Celecoxib: New pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *J. Med. Chem.* **2004** , 47, 550-557.

- [56] Di Fiore, A.; Pedone, C.; D'Ambrosio, K.; Scozzafava, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrases inhibitors: Valdecoxib binds to a different active site region of the human isoform II as compared to the structurally related, cyclooxygenase II "selective" inhibitor celecoxib. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006** , 16, 437-422.
- [57] Dognè, J. M.; Thiry, A.; Pratico, D.; Masereel, B.; Supuran, C. T. Dual carbonic anhydrase-cyclooxygenase-2 inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007** , 7, 885-891.
- [58] Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Onishi, S.; Vullo, D.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning characterization and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.* **2007** , 15, 7229-7236.
- [58] Degani, I.; Fochi, R.; Spunta, G. Heteroaromatic cations. VI. Synthesis Of Thiachromylum Perchlorate Derivatives, *Bollettino Scientifico Della Facoltà Di Chimica Industriale Di Bologna*, 1966 , 24, 75-91.
- [59] Bruno, O.; Schenone, S. ; Ranise, A. Antiinflammatory agents: new series of N-substitued amino acids with complex pyrimidine structures endowed with antiphlogistic activity. *Il Farmaco* ,**1999**, 54, 95
- .
- [60] Chusae-Lee et al. *Huaxue Xubao* , **1956**, 22, 371-378
- [61] Marini, Anna Maria; Da Settimo, Federico; Salerno, Silvia; La Motta, Concettina; Simonini Francesca; Taliani, Sabrina; Bertini, Daniele; Già Ornella; Della Via, Lisa. Synthesis and vitro antiproliferative activity of new substituted benzo[3',2':5,6]thiopyrano[4,3-d]pyrimidines. *Journal of heterocyclic chemistry* **2008**,45(3),745-749
- [62] PCT Int. Appl. 2003051886 (**2003**)

Ringraziamenti

Non è semplice ringraziare, in poche righe, tutte le persone che hanno contribuito alla nascita e allo sviluppo di questa tesi di laurea: chi con una collaborazione costante, chi con un supporto morale, chi con consigli e suggerimenti o solo con parole di incoraggiamento.

Desidero innanzitutto ringraziare la Professoressa Sabrina Taliani e la Dottoressa Silvia Salerno che mi hanno dato fiducia permettendomi di svolgere la tesi e vivere questa bellissima esperienza presso i loro laboratori.

Grazie a Betti, per avermi accompagnato in questo percorso nuovo con pazienza e professionalità, grazie per la passione e la determinazione che ogni giorno mette nel suo lavoro, grazie di cuore senza il suo supporto questa tesi non esisterebbe!

Vorrei ringraziare anche Manuela e Marco sempre presenti e pronti a darmi un consiglio e a farmi sorridere.

Grazie ai miei genitori Francesca e Marco e a mia Nonna Raffaella per il sostegno ed il grande aiuto che mi hanno dato ed in particolare per essermi sempre stati vicini e aver condiviso con me ansie e soddisfazioni durante questi anni di studio. Siete il mio punto di riferimento, grazie infinite!

Grazie a Matteo per avermi supportato e sopportato in questi anni di studio, per la pazienza e l'aiuto costante, per avermi fatto sorridere quando ne avevo bisogno. Grazie con tutto il cuore.

Grazie a Samantha per avermi accompagnato nel percorso universitario, sei stata una bella sorpresa e un' aiuto importante prima di ogni esame.

Grazie a Eleonora la mia tutor personale, sempre pronta a darmi consigli utili e che per l'ultimo esame mi ha fatto un bellissimo regalo, la piccola Ginevra. Grazie infinite.

Grazie alla mia Cip, insieme dal Liceo e sempre presente nei momenti importanti più o meno difficili della mia vita, sei la mia forza. Ti voglio bene.

Grazie a Giulia che anche se lontana sei sempre riuscita a far sentire la tua presenza.

Grazie a Fabrizio e Anna, i miei “Consiglieri” , sempre pronti ad incoraggiarmi e sostenermi.

Grazie ai miei compagni di università, i due Andrea sempre disponibili e gentili.

Grazie a tutte le mie amiche che in questi anni sono state presenti, aiutandomi e sostenendomi quando ne avevo bisogno, grazie di cuore.

Grazie alle mie compagne di laboratorio, Nadia ed Elsa con le quali ho condiviso questo percorso e fatto tante risate.

Un Grazie davvero speciale a chi non è più qui, i mei Nonni sempre presenti nel mio cuore.

Infine grazie a Kira ,la mia cucciolona antistress.

Grazie, Sara.